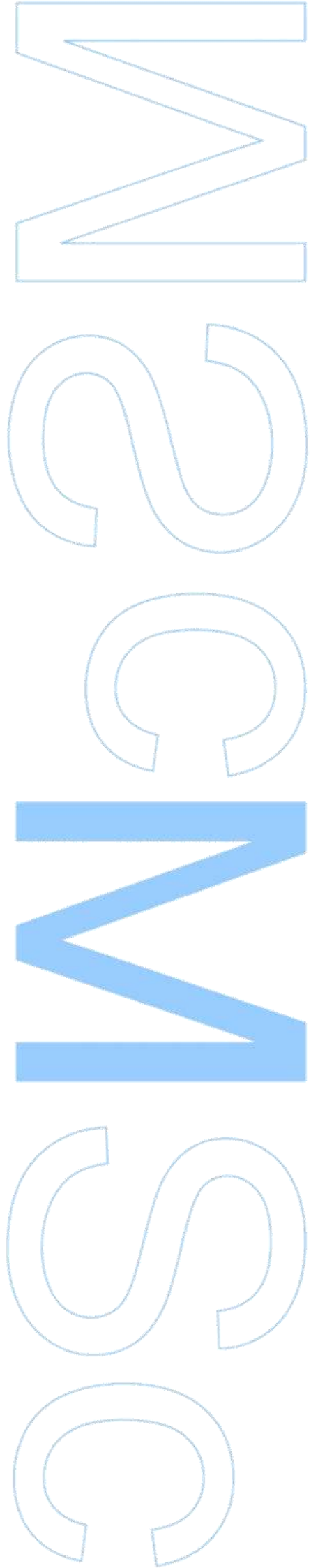
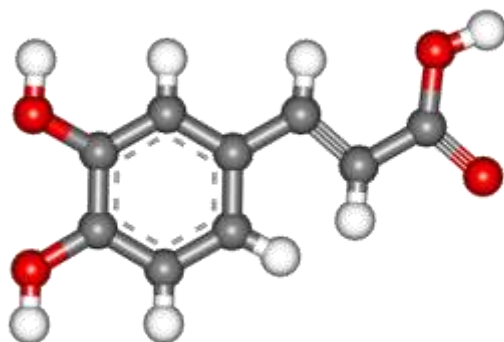


# **Desenvolvimento de Novos Antioxidantes Lipofílicos como Solução Terapêutica para Doenças Neurodegenerativas**

**Daniel Freitas Chavarria**  
Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em  
Bioquímica  
**2014**





# Desenvolvimento de Novos Antioxidantes Lipofílicos como Solução Terapêutica para Doenças Neurodegenerativas

Daniel Freitas Chavarria

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

2014

## **Orientador**

Doutora Fernanda Borges, Professora Associada, Faculdade de Ciências da  
Universidade do Porto



# Agradecimentos

O desenvolvimento e término de mais um ciclo de estudos e, particularmente, deste projeto não seriam possíveis sem a intervenção de diversas pessoas às quais devo os mais sinceros agradecimentos.

Antes de mais, devo agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Fernanda Borges, por ter proposto mais um projeto igualmente desafiante na área da Química Medicinal. As suas palavras de encorajamento e boa disposição inabalável ajudaram-me não só a atingir esta meta, como também a apreciar a jornada.

Ao Tiago Silva, agradeço os conhecimentos transmitidos, o tempo investido e o incentivo constante em cada etapa do protejo. A tua paciência infinita, a necessidade de justificares toda e qualquer ação antes desta ser realizada e a facilidade em entenderes as minhas frases inacabadas ajudaram-me na apreensão dos conceitos.

Ao professor Jorge Garrido, pela disponibilidade em ensinar as bases dos métodos eletroquímicos.

Aos restantes elementos do laboratório, pelo apoio que deram, pela companhia e pela criação de um ambiente descontraído no local de trabalho: Joana Reis, Alexandra Gaspar, Fernando Cagide, Catarina Oliveira, Sofia Benfeito, Carlos Fernandes.

Aos meus amigos e colegas de mestrado que, estando na mesma jornada, superaram as mesmas dificuldades e fizeram parte de momentos que se tornarão nostálgicos. Um obrigado a todos, em especial à Andreia Pereira e ao Pedro Araújo por aceitarem e compreenderem o meu silêncio quase infinito.

Por último, agradeço aos meus pais e irmão, pelo apoio constante durante este e todos os projetos que tive ao longo da minha vida.

## Resumo

O stress oxidativo tem sido implicado na patogénese das doenças neurodegenerativas. De fato, o cérebro é particularmente sensível ao stress oxidativo, uma vez que mantém uma elevada taxa metabólica e uma elevada exposição ao oxigénio e, por outro lado, possui um baixo conteúdo em antioxidantes endógenos. Portanto, o uso de antioxidantes exógenos, como os compostos fenólicos provenientes da dieta, pode ser uma abordagem terapêutica eficaz na prevenção/tratamento de danos oxidativos associados aos processos fisiopatológicos inerentes à neurodegeneração.

Assim, o objetivo deste projeto é o *design* e desenvolvimento de novos antioxidantes com base na estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos com atividade neuroprotetora. Para alcançar este objetivo, efetuaram-se estudos *in vitro* para avaliar as seguintes propriedades: atividade antioxidante, capacidade de quelatação do ferro, potencial redox e comportamento eletroquímico, citotoxicidade e neuroprotecção contra indutor de dano oxidativo em modelo celular. Os ácidos cinâmicos naturais usados como modelo foram utilizados como padrões nestes ensaios.

A síntese dos derivados do ácido hidroxicinâmico envolveu uma sequência de três passos reacionais. No primeiro passo efetuou-se a proteção dos fenóis com um éter de alcoxialquilo seguindo-se uma reação com o crotonato de etilo para a introdução do espaçador lipofílico. A remoção do grupo protetor levou à obtenção dos compostos finais. Cada intermediário foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY and HSQC) e por espetrometria de massa (EM-IE). A capacidade de neutralização de radicais livres foi avaliada através dos métodos de DPPH $^{\cdot}$ , ABTS $^{+\cdot}$  e GO $^{\cdot}$ . O método da ferrozina foi usado na avaliação da capacidade de quelatação do ferro (II). O potencial redox foi avaliado através da voltametria de impulso diferencial e por voltametria cíclica. O uso de métodos computacionais permitiu a determinação teórica das propriedades físico-químicas dos compostos. Por último, foram realizados ensaios em linhas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y para a citotoxicidade, via MTT, e o potencial neuroprotetor contra os danos oxidativos induzidos pela 6-hidroxidopamina (6-OH-DA).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a introdução de uma ligação dupla adicional entre o anel aromático e o ácido carboxílico nos ácidos hidroxicinâmicos aumentou a lipofilia, a atividade antioxidante e a atividade neuroprotetora relativamente aos modelos naturais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Stress oxidativo; Antioxidantes; Ácidos Hidroxicinâmicos.

## Abstract

Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. In fact, the brain is particularly sensitive to oxidative stress: on one hand it requires an elevated neuronal metabolic rate and, consequently there is a high oxygen exposure, and on the other hand the low pool of local endogenous antioxidants is not enough to counterbalance the disproportionate production of oxidative species. Therefore, the use of exogenous antioxidants like diet-associated phenolic compounds could be an effective therapeutic approach for prevention/treatment of oxidative damage events.

Therefore, the goal of the present project is the design and development of new hydroxycinnamic acid based antioxidants with neuroprotective activity. To achieve the goal the *in vitro* antioxidant, cytotoxicity and neuroprotection properties of the synthesized compounds was evaluated. The naturally occurring parent cinnamic acids were used as standards for the *in vitro* assays.

Hydroxycinnamic acid based derivatives were obtained in a three step process. The first step comprised the phenol protection of the starting material with an alkoxyalkyl ether and a subsequent one with ethyl crotonate for the introduction of the spacer. The protecting group removal led to the final compounds. Each intermediate was characterized by NMR spectroscopy ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY and HSQC) and mass spectrometry (EI-MS). The scavenging activity of the synthesized compounds was evaluated by three different methods: DPPH $^{\cdot}$ , ABTS $^{+}$  and galvinoxyl. The ferrozine assay was used for the evaluation of iron (II) chelating capacity. The evaluation of the redox potential was carried out by differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry. A theoretical determination of physico-chemical properties (e.g. lipophilicity) was performed by computational methods. Finally, cell-based assays were performed in SH-SY5Y neuroblastoma cell lines in order to evaluate the cytotoxicity, via MTT endpoint, of the compounds as well as the neuroprotection profile against 6-hydroxydopamine (6-OH-DA)-induced damage.

The results obtained show that the introduction of an additional double bond between the aromatic ring and the carboxylic acids on hydroxycinnamic acid system significantly improves not only the lipophilicity, but also antioxidant and neuroprotective properties of the parent compounds.

**Keywords:** Oxidative Stress; Antioxidants; Hydroxycinnamic acids.

# Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice de tabelas.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Espécies reativas e stress oxidativo.....	2
1.1.1 Produção endógena de espécies reativas.....	3
1.2 Envolvimento do stress oxidativo na neurodegeneração.....	4
1.2.1 Doença de Alzheimer.....	5
1.2.2 Doença de Parkinson.....	7
2. O Projeto.....	10
2.1 Antioxidantes.....	11
2.1.1 Compostos fenólicos.....	12
2.1.1.1 Modulação do stress oxidativo pelos polifenóis.....	13
2.1.1.1.1 Neutralização de radicais livres.....	14
2.1.1.1.2 Quelatação de metais de transição.....	15
2.1.1.1.3 Modulação da expressão genética.....	15
2.1.1.1.4 Inibição enzimática.....	18
2.1.1.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos.....	18
2.1.1.3 Modificação estrutural dos compostos fenólicos.....	20
2.1.1.3.1 Ácidos fenólicos.....	20
2.2 Objetivos do projeto.....	21
3. Materiais e métodos.....	23
3.1 Reagentes e solventes.....	24
3.2 Cromatografia.....	24
3.3 Linha celular e meio de cultura.....	24
3.4 Tratamento estatístico e análise dos dados.....	24
3.5 Instrumentação.....	25
3.6 Métodos gerais de síntese.....	26
3.6.1 Proteção do grupo hidroxilo com éteres de alcóxialquilo.....	27

3.6.1.1	Otimização do protocolo de proteção de fenóis .....	28
3.6.1.1.1	Síntese do 3-metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído (composto 1) .....	30
3.6.1.1.2	Síntese do 3,4-bis((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído (composto 4) .....	30
3.6.2	Reação de introdução do espaçador .....	30
3.6.2.1	Procedimento geral .....	31
3.6.2.1.1	Síntese do ácido 3-metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)cinamilidenoacético (composto 2) .....	31
3.6.2.1.2	Síntese do ácido 3,4-bis-((2-metoxietoxi)metoxi)cinamilidenoacético (composto 5) .....	32
3.6.2.1.3	Síntese do ácido 3,4-dimetoxicinamilidenoacético (DC3) .....	33
3.6.3	Desproteção do grupo hidroxilo .....	34
3.6.3.1	Otimização do protocolo de desproteção de fenóis .....	34
3.6.3.1.1	Síntese do ácido 4-hidroxi-3-metoxicinamilidenoacético (composto DC1) .....	36
3.6.3.1.2	Síntese do ácido 3,4-di-hidroxicinamilidenoacético (composto DC2) .....	37
3.7	Avaliação da atividade antioxidante .....	39
3.7.1	Neutralização de radicais livres .....	39
3.7.1.1	Método do DPPH' .....	40
3.7.1.1.1	Procedimento experimental .....	41
3.7.1.2	Método do ABTS <sup>•+</sup> .....	42
3.7.1.2.1	Procedimento experimental .....	42
3.7.1.3	Método do GO' .....	43
3.7.1.3.1	Procedimento experimental .....	44
3.7.2	Quelatação do ferro (II): método da ferrozina .....	45
3.7.2.1	Procedimento experimental .....	46
3.8	Estudos eletroquímicos: avaliação do potencial redox .....	46
3.8.1	Voltametria de impulso diferencial .....	47
3.8.2	Voltametria cíclica .....	48
3.8.3	Procedimento experimental .....	49
3.9	Avaliação teórica das propriedades físico-químicas .....	50
3.9.1	Procedimento experimental .....	52
3.10	Avaliação da citotoxicidade e neuroproteção em modelo celular .....	52
3.10.1	Procedimento experimental .....	55
4.	Resultados e discussão .....	57
4.1	Síntese de antioxidantes .....	58

4.1.1	Otimização dos procedimentos de proteção e desproteção de fenóis.....	58
4.1.2	Síntese de antioxidantes baseados na estrutura do ácido hidroxicinâmico .....	59
4.2	Elucidação estrutural dos compostos sintetizados .....	61
4.2.1	Ressonância Magnética Nuclear de Protão e COSY .....	61
4.2.2	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono, DEPT e HSQC .....	66
4.3	Avaliação da atividade antioxidante .....	68
4.3.1	Neutralização de radicais livres .....	68
4.3.2	Quelatação do ferro (II) .....	71
4.4	Estudos eletroquímicos: avaliação do potencial redox .....	72
4.5	Avaliação das propriedades físico-químicas.....	76
4.6	Avaliação da citotoxicidade e neuroproteção em modelo celular.....	77
5.	Considerações finais e perspectivas futuras.....	79
6.	Referências bibliográficas .....	82



# Índice de tabelas

Tabela 1.1: Lista de espécies reativas de oxigénio e de azoto. ....	2
Tabela 2.1: estrutura dos principais ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos.....	21
Tabela 3.1: condições avaliadas na proteção do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído. ....	28
Tabela 3.2: condições avaliadas para a remoção do grupo protetor do 3-metoxi-4-(2-metoxietoxi)metoxibenzaldeído.....	35
Tabela 3.3: registo dos volumes de solução de composto 1 mM ( $V_{X\ 1mM}$ ) e de etanol ( $V_{etanol}$ ) para a preparação de soluções com concentração crescente ( $c_{dil}$ ). ....	41
Tabela 3.4: registo dos volumes de solução de composto 1 mM ( $V_{X\ 1mM}$ ) e de etanol ( $V_{etanol}$ ) para a preparação de soluções com concentração crescente ( $c_{dil}$ ) ....	43
Tabela 3.5: registo dos volumes de solução de composto 250 $\mu$ M ( $V_{X\ 250\ \mu M}$ ) e de etanol ( $V_{etanol}$ ) para a preparação de soluções com concentração crescente ( $c_{dil}$ ). ....	44
Tabela 4.1: registo das condições avaliadas na proteção de fenóis com o MEMCI e os respetivos rendimentos.....	58
Tabela 4.2: registo das condições avaliadas na desproteção de fenóis e os respetivos rendimentos.....	59
Tabela 4.3: resultados de RMN de $^1H$ do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e do 3,4-dihidroxibenzaldeído.....	61
Tabela 4.4: resultados de RMN de $^1H$ dos compostos 1 e 4. ....	62
Tabela 4.5: resultados de RMN de $^1H$ dos compostos 2 e 5. ....	62
Tabela 4.6: resultados de RMN de $^1H$ dos compostos DC1 e DC2.....	63
Tabela 4.7: resultados de RMN de $^1H$ dos composto DC3.....	63
Tabela 4.8: resultados de RMN de $^{13}C$ dos compostos sintetizados. ....	67
Tabela 4.9: valores de $IC_{50}$ determinados pelos métodos de DPPH $^{\cdot}$ , ABTS $^{+\cdot}$ e GO $^{\cdot}$ de todos os compostos analisados.....	70

Tabela 4.10: potenciais redox dos compostos sintetizados e dos respetivos ácidos cinâmicos.....	73
Tabela 4.11: Características gerais de fármacos dirigidos ao SNC. ....	76
Tabela 4.12: determinação do peso molecular (PM), coeficiente de partilha octanol/água (logP), número de aceitadores de hidrogénio (n-ON) e número de dadores de hidrogénio (n-OHNH) dos ácidos cinâmicos e seus derivados . .	77

# Índice de figuras

Fig. 1.1: Formação de espécies reativas de oxigénio e de azoto. ....	4
Fig. 1.2: Papel do stress oxidativo no desenvolvimento da doença de Alzheimer. ....	6
Fig. 1.3: Envolvimento da oxidação da dopamina na doença de Parkinson.. ....	8
Fig. 2.1: Classificação dos antioxidantes em classes. ....	11
Fig. 2.2: Classificação dos compostos fenólicos. ....	13
Fig. 2.3: Mecanismos de neutralização de radicais livres (1) HAT; (2) SET-PT; (3) SPLET.. ....	14
Fig. 2.4: características estruturais dos polifenóis associadas à quelatação de metais....	15
Fig. 2.5: mecanismo proposto para a regulação da via do Keap1/Nrf2/ARE. ....	16
Fig. 2.6: mecanismo proposto para a reação entre os aceitadores de Michael e os grupos sulfidrilo das cisteínas da Keap1.....	17
Fig. 2.7: difenóis e produtos da oxidação.....	18
Fig. 2.8: percurso dos polifenóis e dos seus metabolitos no organismo. ....	19
Fig. 3.1: membros principais da família dos éteres de alcoxialquilo. ....	26
Fig. 3.2: sequência de passos realizados para a síntese de derivados do ácido hidroxicinâmico. ....	27
Fig. 3.3: reação de proteção do grupo hidroxilo com o MEMCI. ....	27
Fig. 3.4: reação de elongação do aldeído. ....	30
Fig. 3.5: reação de desproteção do grupo hidroxilo com a resina Amberlyst® 15. ....	34
Fig. 3.6: estrutura química dos compostos avaliados pelos métodos de DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> e GO <sup>•</sup> . ....	40
Fig. 3.7: reação de neutralização do radical DPPH <sup>•</sup> por um antioxidante dador de átomos de hidrogénio (AH).....	41

Fig. 3.8: formação do radical $ABTS^{\bullet+}$ através da oxidação do ABTS pelo $K_2S_2O_8$ (a). Neutralização do radical $ABTS^{\bullet+}$ pelo antioxidante AH (b). .....	42
Fig. 3.9: reação de neutralização do radical $GO^{\bullet}$ pelo antioxidante.....	44
Fig. 3.10: estrutura química da ferrozina.....	45
Fig. 3.11: representação de uma célula eletroquímica comum. ....	47
Fig. 3.12: (a) forma do potencial e (b) voltamograma resultante da voltametria de impulso diferencial. ....	48
Fig. 3.13: (a) potencial em escada usado em voltametria cíclica. (b) voltamograma cíclico simulado para uma transferência reversível de um eletrão. ....	49
Fig. 3.14: representação da barreira hematoencefálica e de outros componentes da unidade neurovascular. ....	50
Fig. 3.15: vias de transporte ao longo da barreira hematoencefálica . ....	51
Fig. 3.16: Sequência de passos realizados na avaliação da citotoxicidade e neuroproteção dos compostos em células de neuroblastoma.....	53
Fig. 3.17: câmara de Neubauer e dimensões associadas.....	54
Fig. 3.18: Redução do MTT no respetivo formazano. ....	55
Fig. 4.1: reações de proteção e desproteção de grupos hidroxilo. ....	58
Fig. 4.2: rendimentos obtidos em cada um dos passos de síntese dos derivados do ácido hidroxicinâmico. ....	60
Fig. 4.3: representação geral dos desvios químicos e constantes de acoplamento dos prótons (a) do anel aromático, (b) do grupo MEM e (c) do espaçador . ....	64
Fig. 4.4: COSY do composto DC1. ....	65
Fig. 4.5: Desproteção do próton $H\beta$ por efeito mesomérico negativo.....	65
Fig. 4.6: representação da proteção/desproteção dos prótons dos compostos comparativamente com o intermediário anterior. ....	66

Fig. 4.7: HSQC do composto DC1. ....	68
Fig. 4.8: representação gráfica da percentagem de inibição de radical DPPH <sup>•</sup> em função da concentração de composto-teste [c(μM)]. ....	70
Fig. 4.9: representação gráfica da percentagem de inibição de radical ABTS <sup>•+</sup> em função da concentração de composto-teste [c(μM)]. . ....	70
Fig. 4.10: representação gráfica da percentagem de inibição de radical GO <sup>•</sup> em função da concentração de composto-teste [c(μM)]. ....	71
Fig. 4.11: percentagem de quelatação do ferro dos compostos analisados a uma concentração de 100 μM. ....	72
Fig. 4.12: Voltamogramas de impulso diferencial de soluções 0,1 mM de (—) DC1, (—) DC2 e (—) DC3 em tampão fosfato pH 7,4. ....	73
Fig. 4.13: representação gráfica dos valores de IC <sub>50</sub> obtidos nos métodos do DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> e GO <sup>•</sup> em função do potencial redox. ....	74
Fig. 4.14: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) CAF e (—) DC2 em tampão fosfato pH 7,4.....	74
Fig. 4.15: reversibilidade da reação de oxidação de catecóis. ....	75
Fig. 4.16: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) FER e (—) DC1 em tampão fosfato pH 7,4. ....	75
Fig. 4.17: Dimerização do radical fenoxilo através da formação de uma ligação (a) C-C e (b) C-O. ....	75
Fig. 4.18: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) DMC e (—) DC3 em tampão fosfato pH 7,4. ....	76
Fig. 4.19: citotoxicidade dos compostos sintetizados a concentrações de 1 e 10 μM. ....	77
Fig. 4.20: capacidade neuroprotetora dos compostos sintetizados a concentrações de 1 e 10 μM.. ....	78

## Lista de abreviaturas

6-OH-DA: 6-hidroxidopamina

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ABTS: Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ABTS<sup>•+</sup>: Radical catiónico do 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

ALDH: Aldeído Desidrogenase

APP: *Amyloid precursor protein*

ATP: Adenosina Trifosfato

ARE: *Antioxidant Response Element*

A $\beta$ : Beta-amilóide

BHE: Barreira hematoencefálica

CAF: Ácido Cafeico

CAT: Catalase

CCF: Cromatografia em Camada Fina

CDCl<sub>3</sub>: Clorofórmio deuterado

COMT: Catecol O-metiltransferase

COX: Cicloxigenase

Cul3-Rbx1: *E3 ubiquitin ligase Cullin3-RING box1*

DIPEA: Diisopropiletilamina

DA: Doença de Alzheimer

DMC: Ácido Dimetoxicinâmico

DMEM: *Dublecco's modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DN: Doenças neurodegenerativas

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

DP: Doença de Parkinson

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

DPPH<sup>•</sup>: Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EM/IE: Espectrometria de Massa de Impacto Eletrónico

ER: Espécies Reativas

ERA: Espécies Reativas de Azoto

ERO: Espécies Reativas de Oxigénio

EPO: Eosinófilo-peroxidase

FAD: *Flavin Adenine Dinucleotide*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FER: Ácido Ferúlico

GO<sup>•</sup>: Radical Galvinoxilo

GPx: Glutathione Peroxidase

HAT: *Hydrogen Atom Transfer*

HNE: 4-hidroxi-2,3-nonenal

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LOX: Lipoxygenase

Maf: *Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein*

MAO: Monoamina Oxidase

MDA: Malondialdeído

MEM: 2-metoxietoximetilo

MEMCl: Cloreto de 2-metoxietoximetilo

MPO: Mieloperoxidase

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetoxitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NFTs: *Neurofibrillary Tangles*

NMP: *N*-metil-2-pirrolidona

NOS: Óxido Nítrico Sintetase

NOX: NADPH oxidase

NRF2: *Nuclear factor-E2-related factor-2*

PBS: *Phosphate Buffered Solution*

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SET-PT: *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido dismutase

SPLET: *Sequential Proton Loss Electron Transfer*

TBAI: Iodeto de tetrabutílamónio

TRX: Trolox

XO: Xantina Oxidase

## 1.Introdução



1.1 Espécies reativas e stress oxidativo

As espécies reativas de oxigénio (ERO) e de azoto (ERA) são pequenas moléculas resultantes de processos biológicos dos organismos aeróbios [1], como a produção de adenosina trifosfato (ATP) pela cadeia respiratória na mitocôndria ou a degradação de ácidos gordos de cadeia longa nos peroxissomas. Também podem ser produzidas por diversas enzimas, incluindo a xantina oxidase (XO), fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (NADPH, do inglês “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*”) oxidase (NOX), a óxido nítrico sintetase (NOS, do inglês “*nitric oxide synthase*”), lipoxigenase (LOX) e cicloxygenase (COX).[2]

As espécies reativas (ER) representam um grupo amplo de espécies radicalares e não radicalares com diferentes reatividades (tabela 1.1). [3] Dependendo da sua concentração, desempenham funções benéficas ou nocivas nos sistemas biológicos. Em concentrações baixas/moderadas, estão envolvidas na resposta imunitária (ex: defesa contra patogéneos através do *burst* oxidativo) [4] e na regulação de diversas vias de sinalização celular relacionadas com o crescimento celular, relaxamento do músculo liso, respostas imunológicas, síntese de biomoléculas e modulação da pressão arterial. [3]

Tabela 1.1: Lista de espécies reativas de oxigénio e de azoto. Adaptado de [3].

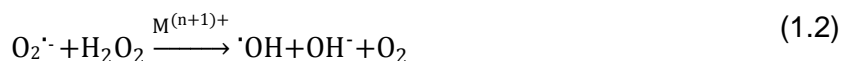
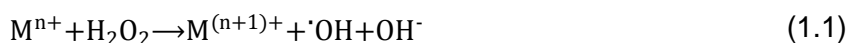
Nome	Símbolo	Nome	Símbolo
Anião superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Óxido nítrico	NO <sup>•</sup>
Peróxido de hidrogénio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxinitrito	ONOO <sup>-</sup>
Radical hidroxilo	•OH	Nitroxilo	HNO
Radical peroxilo	ROO <sup>•</sup>	Nitrito	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Radical hidroperoxilo	HOO <sup>•</sup>	Nitrato	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Singleto de oxigénio	O <sub>2</sub> <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub>	S-nitrosotiol	RSNO
		Dióxido de azoto	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>

Os efeitos nocivos associados às espécies reativas – stress oxidativo e stress nitrosativo – resultam da sua sobreprodução e/ou da diminuição da ação das defesas antioxidantes, isto é, representam uma desregulação do equilíbrio existente entre fatores pró-oxidantes e os antioxidantes. [4] A acumulação de espécies reativas é responsável pela modificação de biomoléculas (ex: proteínas, lípidos, DNA), que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de patologias como o cancro, diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. [3]

### 1.1.1 Produção endógena de espécies reativas

A produção de espécies reativas de oxigénio inicia-se com a formação do anião superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) na cadeia respiratória da mitocôndria ou resulta da atividade da NADPH oxidase ou de metaloenzimas envolvidas no metabolismo oxidativo (fig. 1.1). [5] Este radical é rapidamente convertido em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), seja de forma espontânea ou por ação enzimática. A superóxido dismutase (SOD) acelera esta reação nos sistemas biológicos em cerca de quatro ordens de magnitude, atuando em conjunto com enzimas envolvidas no metabolismo do  $H_2O_2$ , como a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). [6]

Na presença de metais de transição, como o ferro e o cobre, o  $H_2O_2$  pode formar o radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) através das reações de Fenton (equação 1.1) ou de Haber-Weiss (equação 1.2). O  $\cdot OH$  tem um tempo de semi-vida muito curto ( $< 1$  ns) e, ao contrário do  $H_2O_2$ , não pode ser eliminado por enzimas, reagindo com biomoléculas que se encontrem perto do seu local de formação. [7]



O óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) é sintetizado a partir da arginina pela NOS. Quando produzido em quantidades elevadas, pode reagir com o oxigénio ou o anião superóxido, formando-se outras ERA como o nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). [8] A combinação do  $ONOO^-$  com um protão ( $H^+$ ) ou com o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) resultam na formação do dióxido de azoto ( $NO_2\cdot$ ), o qual está envolvido na nitração de proteínas. [9] Este processo leva a alterações na estrutura das proteínas e na sua função biológica. O  $NO_2\cdot$  também pode ser gerado a partir da oxidação do  $NO_2^-$  catalisada por hemeperoxidases (ex: mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO)), na presença de  $H_2O_2$ . Alternativamente, o  $NO_2\cdot$  está envolvido na nitrosilação de tióis (RSH), formando-se S-nitrosotióis (RSNO). [8,10]

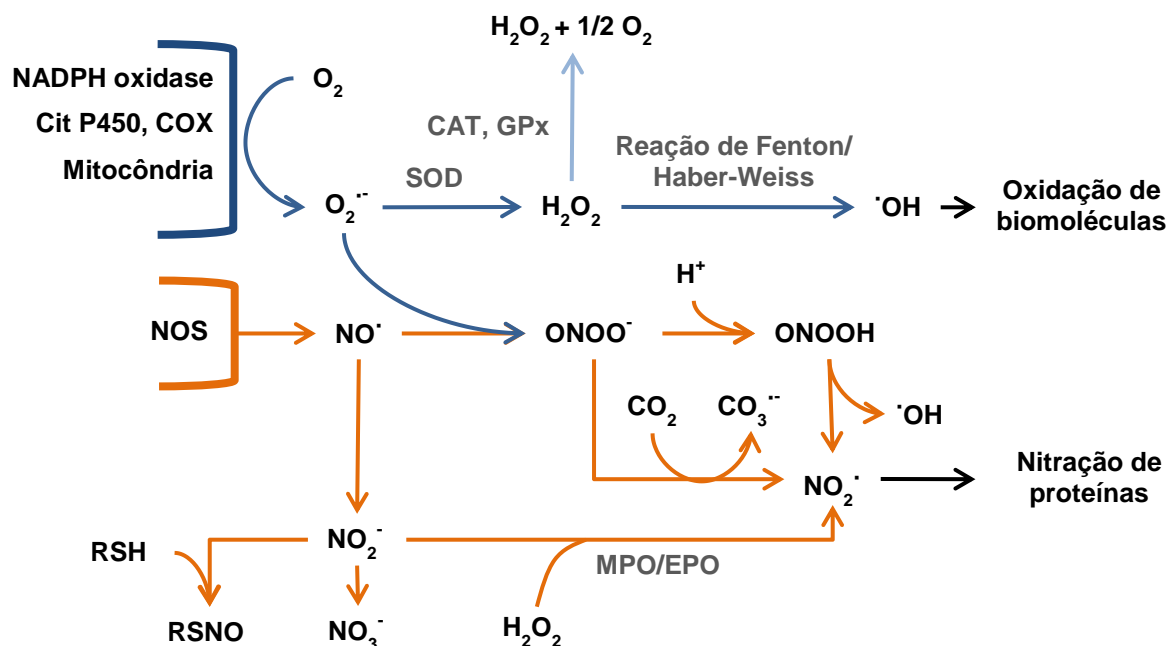


Fig. 1.1: Formação de espécies reativas de oxigênio e de azoto. Adaptado de [8 - 11].

## 1.2 Envolvimento do stress oxidativo na neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas (DN) englobam diferentes patologias nas quais se observa a perda de células do sistema nervoso e a formação de agregados proteicos, culminando em perda funcional (ataxia) ou em demência. [12, 13] A sua incidência aumenta com o aumento da esperança média de vida. [14] A neurodegeneração resulta de uma complexa rede de processos fisiopatológicos que actuam ao longo de um período de tempo extenso. Desta forma, as manifestações características das DN surgem décadas após o seu início, o que dificulta o seu diagnóstico atempado e permite apenas uma intervenção terapêutica paliativa. [15]

Apesar de a neurodegeneração ser um processo multifatorial, existem evidências de que o stress oxidativo e nitrosativo estão envolvidos na neurodegeneração. [16, 17] De facto, o cérebro é particularmente vulnerável ao stress oxidativo devido ao consumo elevado de oxigénio (cerca de 20% do total) e consequente formação de ER. [16] Acrescem ainda a baixa atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e a GPx e o elevado conteúdo em ácidos gordos poli-insaturados (suscetíveis à peroxidação lipídica) e em metais de transição como o ferro e o cobre (catalisadores na formação de espécies reativas). [13, 16]

### 1.2.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que se caracteriza pela perda de neurónios corticais e hipocampais e pelo correspondente declínio cognitivo. [18] A perda de memória é o sintoma mais comum, sendo muitas vezes acompanhada pela apatia e depressão. [19] Esta doença afeta 7% da população com mais de 65 anos e cerca de 40% da população com mais de 80 anos. [20] Cerca de 1-2% dos casos de DA resultam de fatores genéticos, enquanto os restantes 98-99% representam as formas esporádicas da doença. [21]

A DA caracteriza-se pela perda neuronal e sináptica, proliferação de astrócitos, ativação da microglia, e formação e acumulação de placas senis extracelulares de beta-amiloide (A $\beta$ ), resultante do processamento amiloidogénico da proteína precursora da amiloide (APP, do inglês “*Amyloid Precursor Protein*”), e de emaranhados neurofibrilares (NFTs, do inglês “*Neurofibrillary Tangles*”) derivados da agregação da proteína tau hiperfosforilada no interior das células. [22, 23] A tau é uma proteína estabilizadora dos microtúbulos, e a hiperfosforilação é responsável pela sua agregação aberrante com consequente interrupção do tráfego intraneuronal. [23]

Há uma série de evidências que sugerem que o stress oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento da DA (fig. 1.2). [11]

A disfunção mitocondrial é uma das características da DA. A mitocôndria é a principal fonte de produção de espécies reativas responsáveis pela oxidação do DNA mitocondrial e de biomoléculas essenciais ao desempenho das suas funções. O comprometimento da produção de ATP leva à desregulação dos níveis de cálcio através da interrupção da atividade da bomba de Ca<sup>2+</sup> ATPase presentes no retículo endoplasmático e na membrana plasmática. Os danos oxidativos, a diminuição da síntese de ATP e a desregulação da homeostasia do Ca<sup>2+</sup> comprometem as funções celulares e intervêm na ativação de mecanismos responsáveis pela morte neuronal. [24, 25]

A oxidação de proteínas e do DNA nuclear e mitocondrial é mais elevada nos pacientes com DA. [26, 27] A oxidação de proteínas é, geralmente, um processo irreversível que compromete a sua função. Como a sua degradação é baixa, as proteínas oxidadas tendem a formar agregados tóxicos para a célula. [1]

A desregulação da homeostasia dos metais de transição no cérebro resulta no aumento da sua biodisponibilidade. O Cu<sup>2+</sup> e o Fe<sup>3+</sup> colocalizam-se e formam agregados com a A $\beta$  através da ligação a três resíduos de histidina (His6, His13 e His14). Esta interação promove a oxidação da metionina 35, culminando não só na redução do ião

metálico e formação de ERO através da reação de Fenton, como também na formação de ligações covalentes de Aβ e posterior agregação. [1, 13, 18]

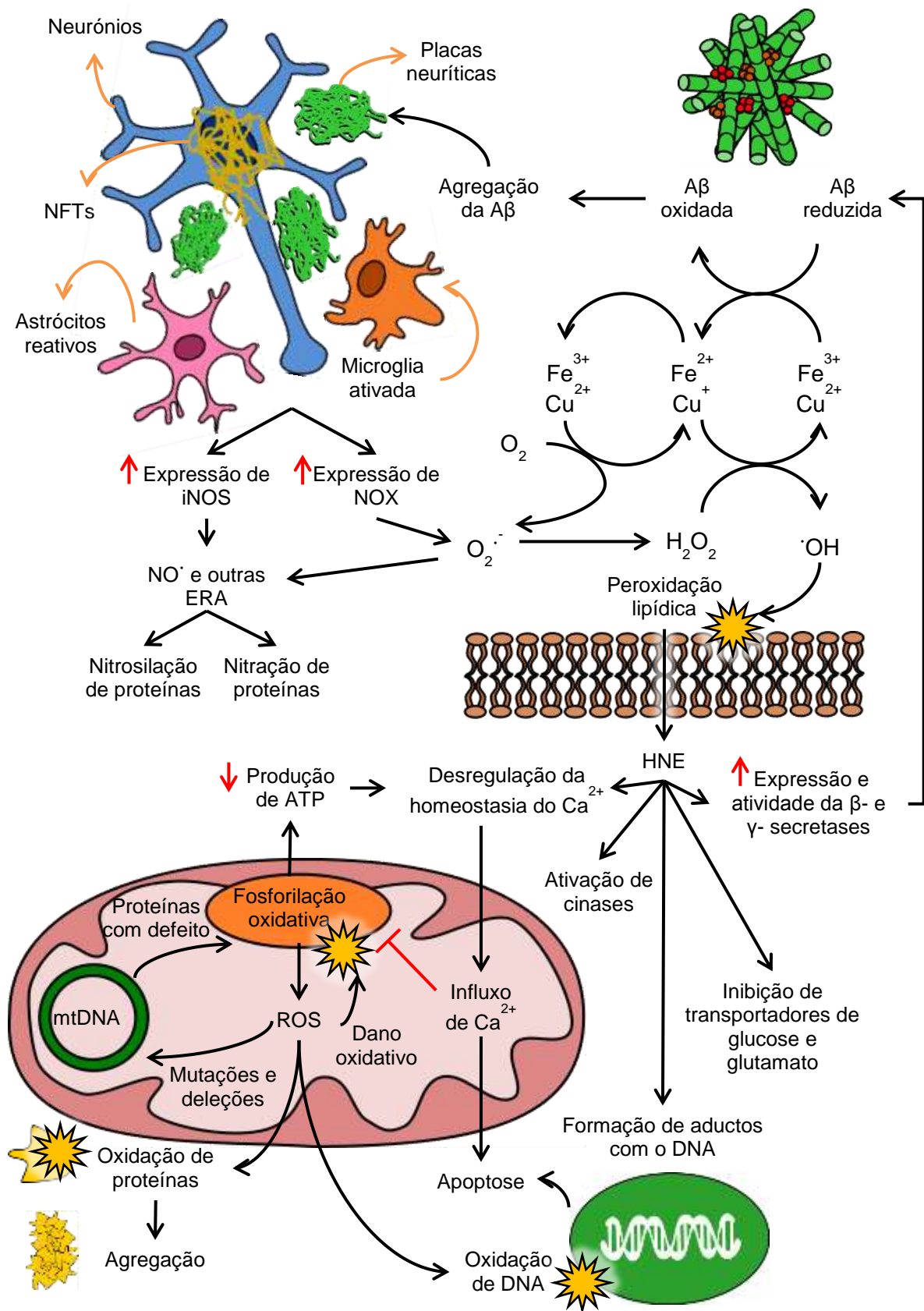


Fig. 1.2: Papel do stress oxidativo no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Adaptado de [18, 24, 28].

As ERO produzidas intervêm no processo de peroxidação lipídica, o que leva à depleção dos lípidos de membrana e à formação de produtos derivados da sua quebra, como a acroleína, malondialdeído (MDA), F2-isoprostanos e 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE). [11] O HNE é muito reativo e forma aductos com o DNA e com proteínas através da ligação covalente a resíduos de cisteína, lisina e histidina via adição de Michael, contribuindo para a alteração das suas funções e levando à inibição dos transportadores de glucose e glutamato, inibição das bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases, ativação de cinases, aumento da atividade e expressão de enzimas envolvidas no processamento amiloidogénico do APP, e desregulação da homeostasia do cálcio. [11, 18, 28, 29]

Os astrócitos reativos e a microglia ativada encontram-se nas proximidades das placas neuríticas. Nestas células observa-se o aumento da expressão da NADPH oxidase e da NOS indutível (iNOS), contribuindo na produção de espécies reativas de oxigénio e de  $\text{NO}^\cdot$  em níveis elevados. [1] O  $\text{NO}^\cdot$  pode atravessar membranas e formar ERA intervenientes na nitração e nitrosilação de proteínas. [18] Neste contexto, o  $\text{NO}^\cdot$  parece estar envolvido na hiperfosforilação da proteína Tau e consequente formação de NFTs. [11]

### 1.2.2 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crónica e progressiva que se caracteriza pela perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra*, responsável pela rigidez progressiva, tremores e bradicinesia. [19] A seguir à DA, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando 1 a 2% da população com mais de 60 anos. [20]

Para além da perda neuronal, a DP caracteriza-se, em termos neuropatológicos, pela presença de corpos de Lewy no corpo celular e de neurites de Lewy nos axónios e dendrites. A  $\alpha$ -sinucleína é o componente principal destas inclusões proteicas insolúveis. [30]

Nos casos idiopáticos e genéticos da DP, o stress oxidativo é um mecanismo comum subjacente à disfunção e morte celulares. [31] À semelhança da DA, a disfunção mitocondrial e os mecanismos associados aos danos oxidativos em biomoléculas e à morte neuronal intervêm no desenvolvimento da DP. [16, 31] A neuroinflamação também desempenha um papel importante, na medida em que a microglia ativada produz ERO e ERA que contribuem para o stress oxidativo e nitrosativo no microambiente em que se encontram. A sobreativação da microglia gera uma resposta neuroinflamatória excessiva e descontrolada, resultando num ciclo vicioso de neurodegeneração. [31]



A auto-oxidação da dopamina resulta na produção de semiquinonas e quinonas que reagem com nucleófilos, como os grupos sulfidrilo presentes nos resíduos de cisteína das proteínas, resultando geralmente na inativação da sua função e no comprometimento da sobrevivência celular. [30] A dopamina quinona pode também ciclizar e formar o aminocromo, envolvido na formação de superóxido e na depleção do dinucleótido de adenina e nicotinamida (NADH, do inglês "*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*") e do NADPH celular através de ciclos redox. [31, 32] Além disso, o aminocromo forma aductos com proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína, complexos I e III da cadeia respiratória, isocitrato desidrogenase, actina e  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, sugerindo que esta molécula intervém na formação de agregados neurotóxicos, na indução da disfunção mitocondrial e na rutura da arquitetura do citoesqueleto e do transporte axonal. [32]



## 2.O Projeto

## 2.1 Antioxidantes

Face à exposição a radicais livres provenientes de diversas fontes, os organismos desenvolveram uma série de mecanismos de defesa contra o stress oxidativo, incluindo mecanismos preventivos, mecanismos de reparação, defesas físicas e defesas antioxidantes. [4]

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que atrasa, previne ou remove os danos oxidativos de uma molécula-alvo. [33] Para serem considerados bons antioxidantes, devem ser eficazes a concentrações baixas e, após a reação com as espécies reativas, o produto da oxidação tem de ser estável ou reciclado facilmente no antioxidante ativo. Estas moléculas podem ser de origem endógena (sintetizadas naturalmente no organismo) ou exógena (produzidas em plantas e obtidas a partir da dieta) (fig. 2.1). [2]

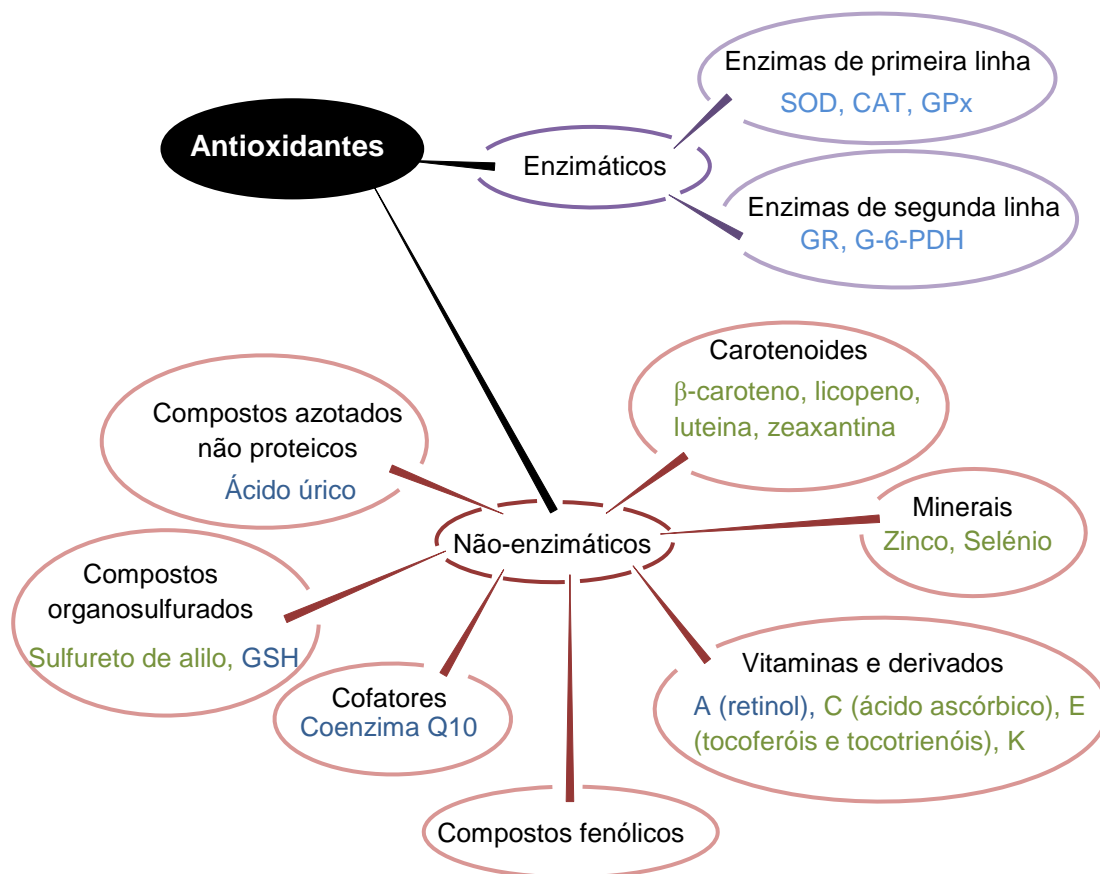


Fig. 2.1: Classificação dos antioxidantes em classes (azul: antioxidantes endógenos; verde: antioxidantes exógenos). Adaptado de [34].

Os antioxidantes endógenos podem ser subdivididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Dentro dos antioxidantes enzimáticos, as enzimas de primeira linha

neutralizam os radicais livres ou previnem a sua formação, enquanto as enzimas de segunda linha intervêm na formação de moléculas necessárias à ação das enzimas de primeira linha (ex: glutathione e NADPH). [2, 34] Os antioxidantes endógenos não-enzimáticos podem pertencer a diversas classes, incluindo vitaminas, cofatores de enzimas, compostos azotados não proteicos e péptidos. [34]

Apesar da sua eficiência, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente, sendo necessários antioxidantes provenientes da dieta para manter as concentrações de radicais livres em níveis baixos. [35] Os antioxidantes exógenos englobam uma grande variedade de grupos, como polifenóis, vitaminas e derivados, carotenoides, compostos organossulfurados e minerais. [36]

Os antioxidantes endógenos e exógenos podem interagir (ex: sinergicamente) na manutenção ou restabelecimento da homeostasia redox, como acontece na regeneração da vitamina E pela glutathione ou pela vitamina C na prevenção da peroxidação lipídica. [37]

### 2.1.1 Compostos fenólicos

Dentro dos antioxidantes provenientes da dieta, os compostos fenólicos ou polifenóis são os mais abundantes [38], podendo ser encontrados em frutos, vegetais, azeite, e em bebidas como o café, vinho, chá e cerveja. [39] Até à data são conhecidas mais de 8000 estruturas diferentes. [40] Dada a sua elevada heterogeneidade estrutural, estão envolvidos em diversos processos, como o crescimento, lignificação, pigmentação, polinização e resistência contra patogêneos, predadores e stresses ambientais. [41]

Os polifenóis resultam do metabolismo secundário das plantas. [40] A sua síntese dá-se a partir da fenilalanina ou da tirosina. Estes aminoácidos produzidos pela via do chiquimato, partindo do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato.[42]

No organismo, os polifenóis possuem uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo as atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral, anticarcinogénica, vasodilatadora [40] e neuroprotetora. [43] Muitos destes efeitos parecem estar relacionados com a sua atividade antioxidante. [40]

Em termos químicos, os polifenóis incluem uma grande variedade de moléculas que possuem um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel aromático, e podem surgir na forma monomérica ou polimérica. [44] A sua divisão em classes é feita com base na sua estrutura química, sendo atualmente agrupados em compostos flavonoides e não flavonoides (fig. 2.2). [45]

Os flavonoides são os polifenóis mais abundantes do reino vegetal. Todos os membros desta classe possuem uma estrutura de fenil benzopirona (C6-C3-C6). [46]

Consoante o grau de oxidação do anel heterocíclico e a abertura do anel central de pirano, podem ser divididos em subclasses diferentes. [47] Podem existir na forma livre ou em conjugados glicosídicos. [46]

Os compostos não flavonoides abrangem uma série de famílias químicas distintas, como os ácidos fenólicos, os taninos, os estilbenos e as cumarinas. [45]

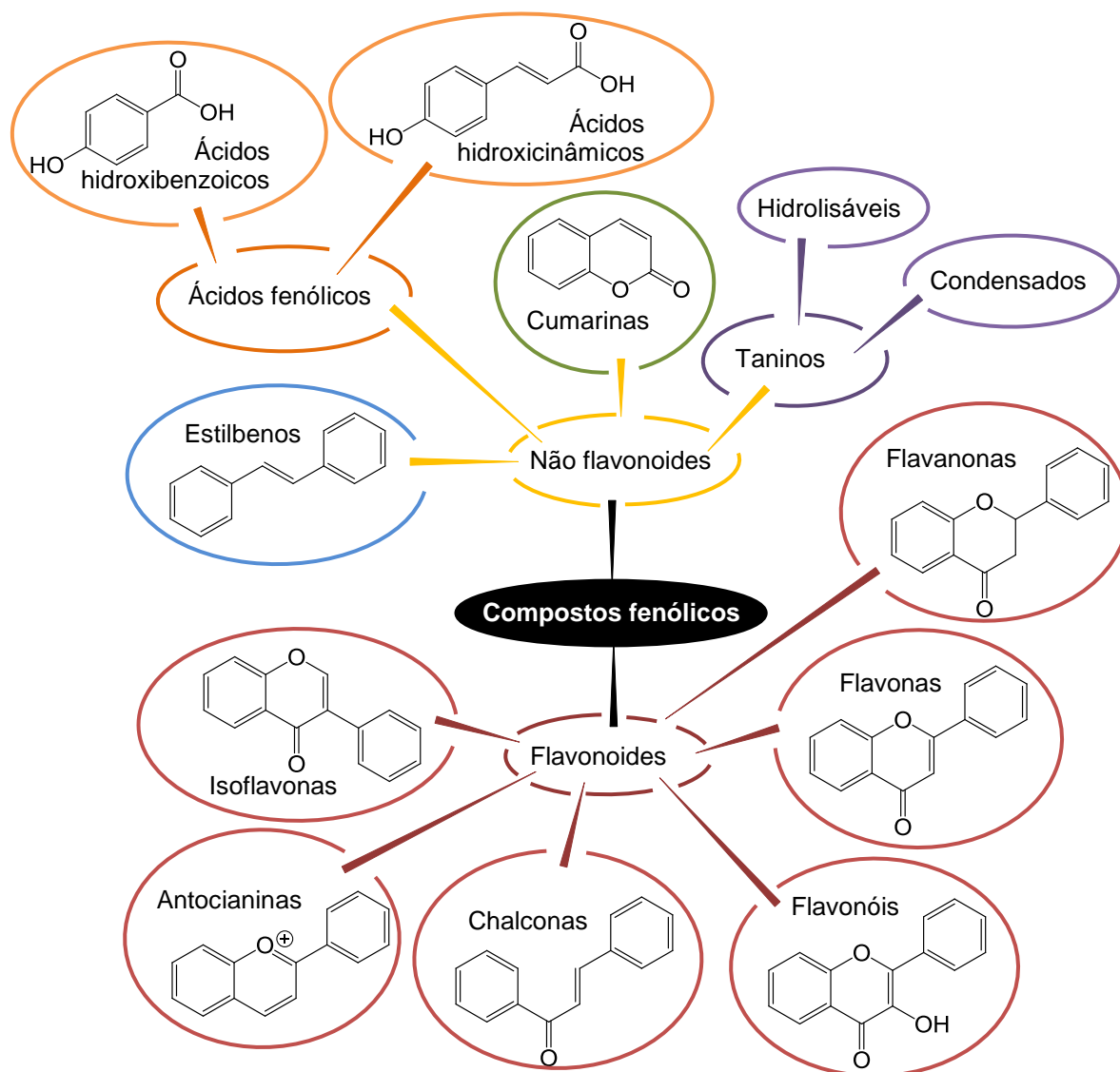


Fig. 2.2: Classificação dos compostos fenólicos quanto à sua estrutura. Adaptado de [36, 48].

#### 2.1.1.1 Modulação do stress oxidativo pelos polifenóis

A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com uma grande variedade de ações biológicas, como a neutralização de radicais livres, a quelatação de metais de transição, a modulação da expressão genética e a inibição de enzimas envolvidas na produção de radicais livres.

### 2.1.1.1.1 Neutralização de radicais livres

A neutralização de radicais livres pelos polifenóis é influenciada pelas suas características estruturais, como a presença de vários grupos hidroxilo ligados a um anel aromático, preferencialmente com a conformação *orto*-di-hidroxi, e de grupos funcionais adicionais, como a ligação dupla (C=C) e o grupo carbonilo (C=O). A estrutura planar é importante na deslocalização eletrónica e nos efeitos de ressonância. [49]

A neutralização de radicais livres pelos compostos fenólicos pode ser descrita através dos seguintes mecanismos: transferência de um átomo de hidrogénio – HAT (do inglês “*Hydrogen Atom Transfer*”) – transferência de um eletrão seguida da transferência de um protão – SET–PT (do inglês “*Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*”) – e transferência de um eletrão após a perda de um protão– SPLET (do inglês “*Sequential Proton Loss Electron Transfer*”). [50]

O HAT dá-se num único passo (fig. 2.3, reação 1) e resulta da remoção do átomo de hidrogénio pelo radical livre através da rutura homolítica da ligação O–H. [51, 52]

Por outro lado, o SET–PT envolve dois passos: a formação de um catião radicalar (fig. 2.3, reação 2a), seguida da sua desprotonação (fig. 2.3, reação 2b). Enquanto o primeiro passo é dependente do potencial de ionização, o segundo depende da entalpia de dissociação do protão do radical  $\text{AOH}^{\bullet+}$ . [51]

O SPLET foi descoberto recentemente [50] e envolve a transferência de um eletrão para o radical (fig. 2.3, reação 3b) após a formação do anião fenolato ( $\text{AO}^-$ ) (fig. 2.3, reação 3a). Este mecanismo depende da capacidade de solvatação de iões pelo solvente e da acidez do fenol. [53]

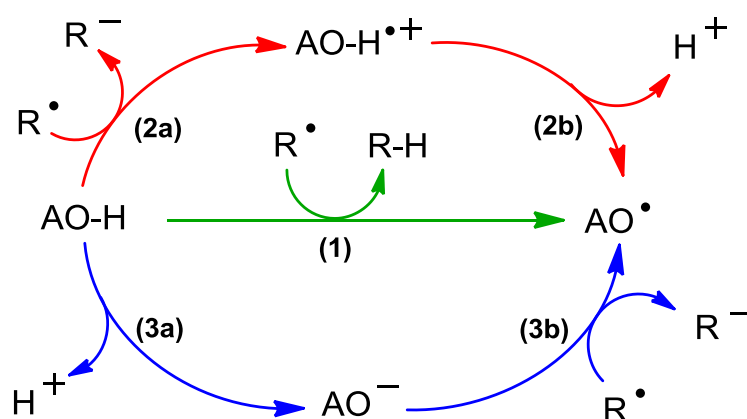


Fig. 2.3: Mecanismos de neutralização de radicais livres (1) HAT; (2) SET-PT; (3) SPLET. Adaptado de [54].

Apesar de estas reações resultarem na formação de outros radicais –  $\text{AOH}^{\cdot+}$  e  $\text{AO}^{\cdot-}$ , a deslocalização do eletrão desemparelhado ao longo da molécula resulta na sua estabilização. [49]

#### 2.1.1.1.2 Quelatação de metais de transição

Como foi referido anteriormente, os metais de transição como o ferro e o cobre podem participar em ciclos redox responsáveis pela catálise da produção de espécies reativas nos sistemas biológicos. A sua acumulação excessiva resulta no stress oxidativo devido aos danos causados em biomoléculas pelos radicais produzidos. Os polifenóis podem formar complexos estáveis com estes metais, evitando os danos oxidativos associados às reações redox. [55] Este mecanismo antioxidante tem sido estudado para o tratamento e prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo. [56]

Os compostos com os grupos catecol, galhol e/ou combinação de grupos hidroxilo com grupos carbonilo presentes nos polifenóis são considerados bons agentes quelantes (fig. 2.4). [41, 57] De facto, as constantes de estabilidade de ligação ao ferro dos polifenóis que contêm os grupos catecol ou galhol são elevadas. [57]

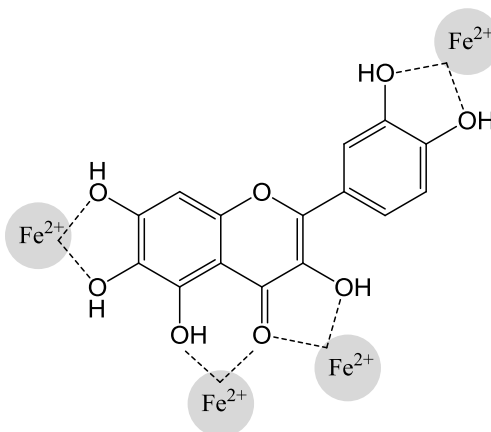


Fig. 2.4: características estruturais dos polifenóis associadas à quelatação de metais. Adaptado de [41].

#### 2.1.1.1.3 Modulação da expressão genética

Os polifenóis podem interagir com uma grande variedade de moléculas pertencentes a mecanismos de sinalização molecular. [40] Um desses mecanismos é a via do Keap1/Nrf2/ARE, responsável pelo controlo da transcrição de genes que codificam proteínas de detoxificação de fase I e II (ex: NAD(P)H quinona redutase-1, glutationa-S-transferase), proteínas transportadoras, subunidades do proteossoma, enzimas antioxidantes (ex: GPx), e enzimas envolvidas na síntese de antioxidantes de baixo peso molecular (ex:  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase, heme oxigenase-1). [58, 59]

O *Nuclear factor-E2-related factor-2* (Nrf2) é um fator de transcrição sensível a variações do estado redox da célula e está envolvido na regulação da transcrição de genes mediada pelo *Antioxidant response element* (ARE). [60] Em condições basais, o Nrf2 encontra-se sequestrado no citoplasma pela proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), a qual se liga à *E3 ubiquitin ligase Cullin3-RING box1* (Cul3-Rbx1) e apresenta o Nrf2 para ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal. [61]

A Keap1 apresenta resíduos de cisteína altamente reativos (C151, C273 e C288) que atuam como sensores para espécies reativas ou para indutores. A modificação dos resíduos por esses sinais químicos conduz a alterações conformacionais da Keap1 e à perda da sua função repressora. O Nrf2 livre é translocado para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição, como o *musculoaponeurotic fibrosarcoma protein* (Maf) e os membros da família Jun, e liga-se ao ARE, resultando na transcrição simultânea de uma grande variedade de genes citoprotetores (fig. 2.5). [61, 62, 63]

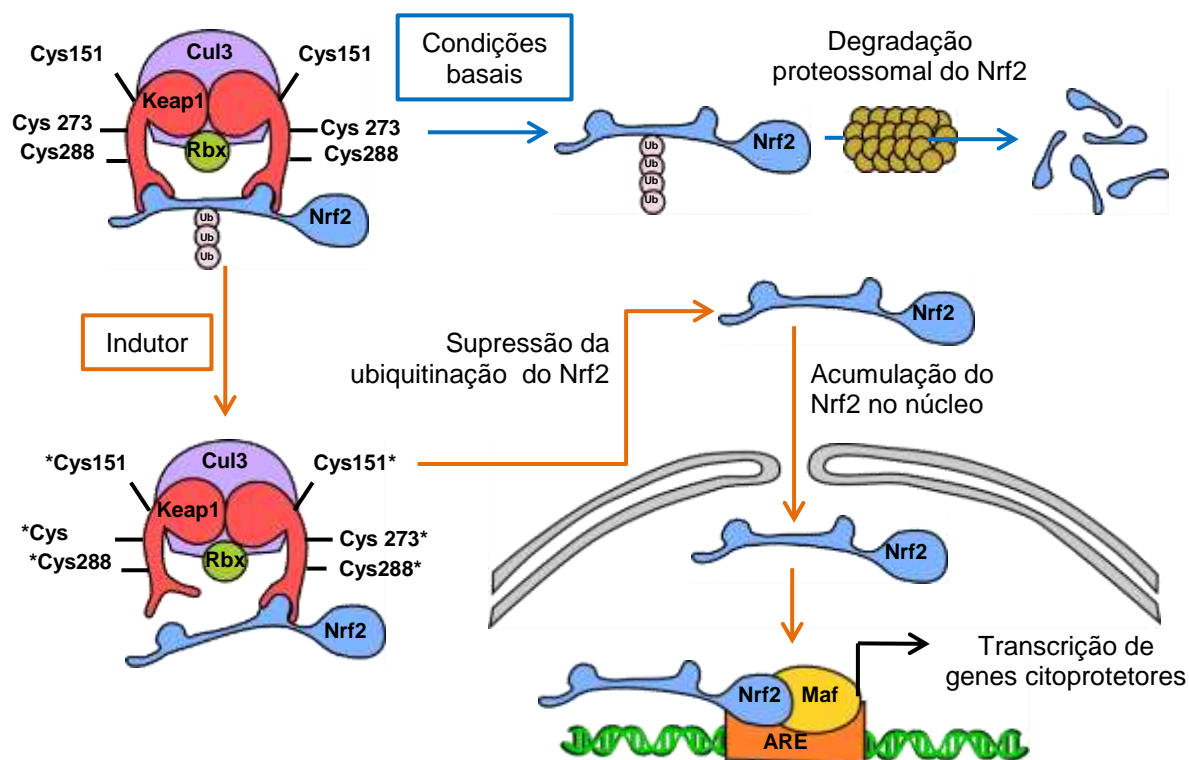


Fig. 2.5: mecanismo proposto para a regulação da via do Keap1/Nrf2/ARE. Adaptado de [61, 64].

A maioria dos indutores (ou ativadores) do ARE conhecidos atualmente são inibidores indiretos da interação Keap1-Nrf2 e formam aductos covalentes com os grupos sulfidrílo da Keap1 por oxidação ou alquilação. A eletrofilia é uma característica comum a todos eles, mas nem todos os eletrófilos conseguem regular a atividade do ARE. Atualmente, os indutores estão divididos em dez classes diferentes com base na sua

estrutura química e na natureza da reação/interação com os grupos sulfidrilo, destacando os aceptadores de Michael e os difenóis oxidáveis e quinonas.[61, 64]

Os aceptadores de Michael (olefinas conjugadas com grupos aceptadores de elétrons) são bases de Lewis macias, podendo reagir com os grupos sulfidrilo da cisteína da Keap1 através de uma adição de Michael (fig. 2.6). Estão presentes em alguns polifenóis, como os flavonoides, cumarinas, curcuminoides e derivados do ácido cinâmico. A presença de grupos hidroxilo na posição *orto* do anel aromático aumenta a sua potência indutora. A curva de dose-resposta dos aceptadores de Michael apresenta uma forma gaussiana, isto é, com efeitos benéficos a doses baixas e citotoxicidade a concentrações mais elevadas.[59, 64]

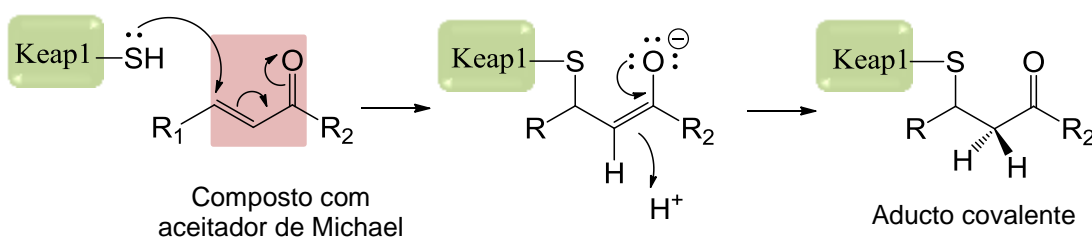


Fig. 2.6: mecanismo proposto para a reação entre os aceptadores de Michael e os grupos sulfidrilo das cisteínas da Keap1. Adaptado de [64].

Considerando o papel dos aceptadores de Michael na via do Keap1/Nrf2/ARE, foi colocada a hipótese dos polifenóis indutores do ARE exercerem o seu efeito de forma semelhante após a sua oxidação em quinonas que contenham aceptadores de Michael. Esta hipótese foi confirmada pela determinação da atividade indutora do ARE de três tipos de difenóis: catecóis (1,2-difenol), resorcinóis (1,3-difenol) e hidroquinonas (1,4-difenol). Os catecóis e as hidroquinonas apresentaram atividade indutora; o mesmo não se observou nos resorcinóis. Estes resultados são consistentes com a maior ou menor capacidade dos difenóis participarem em reações de oxidação-redução (fig. 2.7). [61, 64]

O mecanismo de indução da via do Keap1/Nrf2/ARE pelos difenóis oxidáveis envolve dois passos. Numa primeira fase, ocorre oxidação do difenol na quinona respetiva, seguindo-se a reação da quinona com os resíduos de cisteína do Keap1 importantes na sua função adaptadora de substrato à ubiquitina ligase, e portanto na repressão da Nrf2. [61]



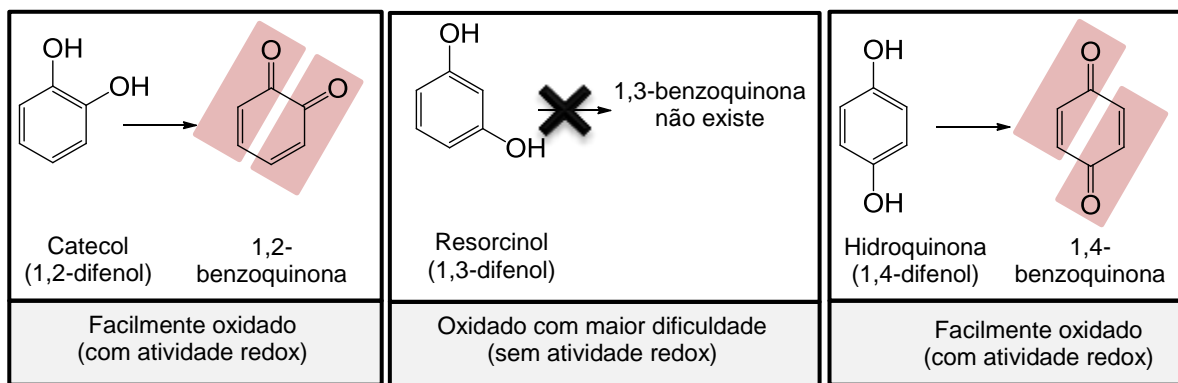


Fig. 2.7: difenóis e produtos da sua oxidação. Os aceptores de Michael estão destacados a vermelho. Adaptado de [64].

#### 2.1.1.1.4 Inibição enzimática

Como foi referido anteriormente, a produção de espécies reativas pode estar associada à atividade de enzimas, como a NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintetase e citocromo P450. [3]

A XO catalisa a oxidação da hipoxantina e xantina a ácido úrico, da qual resulta a formação de peróxido de hidrogénio e de radical superóxido. [65] A forma ativa é constituída por dois monómeros idênticos que atuam de forma independente durante a catálise. Cada subunidade contém um domínio N-terminal com dois centros de [2Fe-2S], um domínio de dinucleótido de flavina e adenina (FAD, do inglês “*Flavin Adenine Dinucleotide*”) central e um domínio C-terminal de ligação da molibdopterina com quatro centros redox alinhados de forma linear. A oxidação ocorre no centro de molibdopterina. [66]

Alguns estudos indicam que os derivados de cumarinas e dos ácidos hidroxicinâmicos podem atuar como inibidores competitivos da XO, sendo mais elevada nos derivados que contêm dois grupos hidroxilo em posição *orto*. A análise da relação estrutura-atividade através de metodologias *in silico* mostrou as interações que se estabelecem entre os polifenóis e os aminoácidos do centro ativo da enzima. [67, 68]

#### 2.1.1.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

O efeito dos compostos fenólicos no organismo é significativamente influenciado por parâmetros de cariz farmacocinético. A concentração plasmática varia no tempo e é determinada pela sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A biodisponibilidade depende de fatores endógenos (ex: atividade das enzimas digestivas, excreção biliar/urinária, biotransformação pela microflora intestinal, epitélio gastrointestinal e fígado) e de fatores exógenos (ex: matriz do alimento e quantidade

ingerida). As propriedades físico-químicas do composto também afetam a sua biodisponibilidade. [42]

Geralmente, os polifenóis são pouco absorvidos no estômago ou no intestino e rapidamente metabolizados e excretados. Portanto, a manutenção de níveis elevados no plasma requer a sua ingestão repetida ao longo do tempo. [47] O percurso dos polifenóis no organismo encontra-se esquematizado na fig. 2.8.

Nos alimentos, a maioria dos polifenóis encontra-se sob a forma de ésteres, glicósidos ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma nativa, sendo necessária a sua hidrólise no estômago (hidrólise ácida), pelas enzimas do intestino ou pela microflora intestinal. [47, 69]

A absorção de polifenóis na forma livre ocorre rapidamente no estômago ou no intestino delgado. Em particular, os ácidos hidroxicinâmicos podem ser absorvidos ao nível gástrico por difusão passiva, ou atravessar o epitélio intestinal através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos ou por sistemas de transporte dependentes de  $H^+$ . [42]

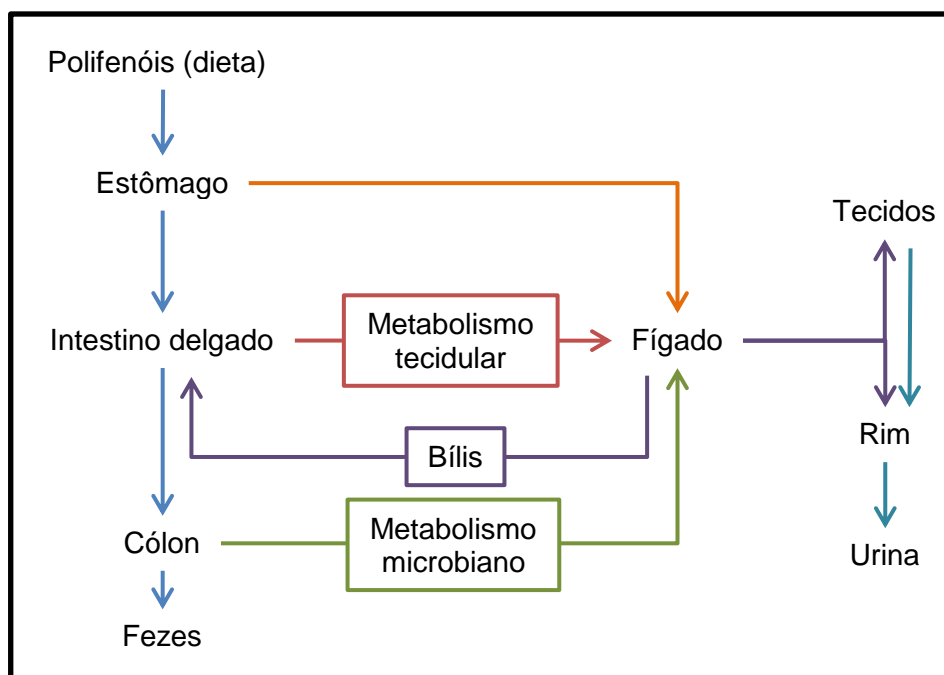


Fig. 2.8: percurso dos polifenóis e dos seus metabolitos no organismo. Adaptado de [70].

Durante a absorção, os polifenóis podem ser conjugados no intestino delgado e, mais tarde, no fígado. Estas modificações incluem reações de desidroxilação, desmetilação, hidrogenação, O-metilação, sulfonação, glucuronidação, e conjugação com glutatona e/ou glicina. [47, 69] Este processo é comum a muitos xenobióticos, restringindo os seus potenciais efeitos tóxicos e facilitando a sua eliminação biliar ou urinária através do aumento da sua hidrofília. Os mecanismos de conjugação são muito

eficientes, de tal forma que polifenóis livres encontram-se em concentrações plasmáticas muito baixas ou são completamente metabolizados. [69, 70]

Os polifenóis em circulação encontram-se ligados a proteínas do plasma, como a albumina, podendo também penetrar nos tecidos, especialmente naqueles em que são metabolizados. A sua eliminação ocorre através da urina ou da biliar. Os compostos excretados pela via biliar estão sujeitos à ação das enzimas bacterianas, como a glucoronidase, no segmento distal do intestino, ocorrendo depois a sua reabsorção. A circulação entero-hepática pode aumentar o tempo de permanência do polifenol no organismo. [69]

#### 2.1.1.3 Modificação estrutural dos compostos fenólicos

Os estudos epidemiológicos desempenham um papel fundamental na investigação da ação preventiva de dietas ricas em antioxidantes no desenvolvimento e progressão de doenças. De facto, o consumo de alimentos ricos em polifenóis está inversamente correlacionado com o desenvolvimento de doenças associadas ao stress oxidativo. [37, 38] No entanto, a sua biodisponibilidade é um fator limitante do seu sucesso terapêutico. [71]

Neste sentido, tem surgido um grande interesse na modificação química dos compostos fenólicos já existentes de modo a alterar as suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), aumentando a sua potência e eficácia. [72] O desenho racional de novos compostos pode levar à descoberta de moléculas bioativas com potencial terapêutico. [71]

##### 2.1.1.3.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos representam cerca de um terço dos fenóis provenientes da dieta, [44] e encontram-se nas plantas na forma livre ou ligados a ácidos orgânicos, açúcares e lípidos. [39] Estes ácidos representam uma subclasse de fenóis com um grupo ácido carboxílico. O pKa do hidrogénio fenólico é próximo de 10, enquanto o do grupo ácido carboxílico encontra-se entre 4 e 5. [73] Os compostos pertencentes a esta subclasse podem ser divididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos. Os derivados mais comuns de cada um dos grupos diferem no padrão de hidroxilação ou metilação dos grupos hidroxilo do anel aromático (tabela 2.1) [74]

Os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e sirínico, partilham uma estrutura C6-C1 característica dos ácidos hidroxibenzoicos. [44] Os ácidos hidroxicinâmicos possuem uma estrutura de fenilpropanóides (estrutura C6-C3), na qual

um anel aromático se encontra ligado a uma cadeia lateral de três carbonos com uma ligação dupla com configuração *trans*. [42] Os derivados mais abundantes são os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. [44, 74]

Tabela 2.1: estrutura dos principais ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos.

		Ácidos Hidroxibenzoicos	Ácidos hidroxicinâmicos
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Composto	Composto
H	H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Ácido <i>p</i> -cumárico
OH	H	Ácido protocatecuico	Ácido cafeico
OCH <sub>3</sub>	H	Ácido vanílico	Ácido ferúlico
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Ácido siríngico	Ácido sinápico
OH	OH	Ácido gálhico	_____

A capacidade de neutralização de radicais livres e de ligação ao ferro dos ácidos hidroxicinâmicos é superior à dos ácidos hidroxibenzoicos correspondentes. A ligação dupla adicional aumenta a capacidade de doação de átomos de hidrogénio e a estabilização do radical resultante da oxidação. O grupo etilénico também parece ter alguma influência na capacidade de quelatação. [75, 76]

No sentido de aumentar a sua biodisponibilidade, os ácidos fenólicos têm sido alvo de modificações estruturais com vista a aumentar a sua lipofilia, mantendo ou melhorando as propriedades antioxidantes dos modelos naturais. [72] Algumas das alterações efetuadas incluem esterificações [71, 77], amidações, [17] e a conjugação com catiões lipofílicos. [78]

## 2.2 Objetivos do projeto

O objetivo principal deste projeto passou pela síntese de derivados lipofílicos dos ácidos hidroxicinâmicos, através da introdução de uma ligação dupla adicional com configuração *trans* comparativamente aos modelos existentes na natureza, e posterior avaliação de algumas das suas propriedades.

O uso da ressonância magnética nuclear (RMN) possibilitou a elucidação estrutural dos compostos finais e dos seus intermediários; a estrutura dos compostos finais foi ainda caracterizada por espectrometria de massa de impacto eletrônico (EM/IE).

Realizaram-se ensaios *in vitro* para avaliar a neutralização de radicais livres (métodos do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>) e radical 4-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno]metil]-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenoxilo ou galvinoxilo (GO<sup>•</sup>)), a capacidade de quelatação do ferro (II) (método da ferrozina), as propriedades redox (voltametria de impulso diferencial e voltametria cíclica) e a citotoxicidade e neuroproteção em modelo celular.

Foi ainda efetuada o cálculo *in silico* de algumas propriedades físico-químicas dos ácidos hidroxicinâmicos e dos seus derivados sintetizados.

### 3. Materiais e métodos

### 3.1 Reagentes e solventes

Os solventes e reagentes foram adquiridos das firmas Merck, Sigma-Aldrich, Carbo Erba e Fluka.

### 3.2 Cromatografia

As reações realizadas foram controladas por cromatografia em camada fina (CCF), utilizando-se para o efeito placas de alumínio revestidas por uma camada de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (MERCK®) com uma espessura de 0,2 mm. Os cromatogramas foram revelados num aparelho Vilber Lourmat por ação de luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm e/ou 365 nm, recorrendo-se também ao uso de uma solução metanólica de cloreto férrico a 10%.

Nas purificações por cromatografia em coluna utilizou-se como fase estacionária o gel de sílica 60 (*Carlo Erba Reactifs-SDS*) de dimensões 0,040-0,063 mm.

As fases móveis usadas na CCF e na cromatografia em coluna são referidas em cada síntese mencionando, no caso de uma mistura de solventes, as proporções usadas de cada um dos componentes.

### 3.3 Linha celular e meio de cultura

A linha celular de neuroblastoma SH-SY5Y foi adquirida da *The American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA).

Durante a fase de crescimento, as células foram mantidas em meio de cultura completo – *Dublecco's modified Eagle Medium* (DMEM/F12) – suplementado com soro fetal bovino (FBS, do inglês "*Fetal Bovine Serum*") (10%), Glutamax (1%) e penicilina-estreptomicina (1%). Os reagentes foram obtidos a partir da firma Gibco. Durante a incubação das células com os compostos utilizou-se um meio de cultura sem FBS.

### 3.4 Tratamento estatístico e análise dos dados

Os resultados obtidos encontram-se expressos sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, 3 experiências independentes. As comparações estatísticas entre os grupos controlo e os grupos teste foram efetuadas através da análise de variância (ANOVA-1) seguida de teste de comparações de Dunnett ( $\alpha = 0,05$ , intervalo de confiança (IC) = 95%). Os detalhes adicionais encontram-se expostos em cada figura. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $p$  inferiores a 0,05. A

construção dos gráficos e a análise estatística foram efetuadas recorrendo ao software GraphPad Prism 5 ® (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037 USA).

### 3.5 Instrumentação

Durante a síntese dos compostos, as pesagens foram efetuadas na balança *Kern ABJ-NM/ABS-N*. Os solventes foram evaporados com recurso à pressão reduzida num evaporador rotativo *Büchi Rotavapor R-210*. Utilizou-se ainda uma estufa de vácuo *Vacuum Oven Mti Corporation*.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional de protão (RMN de  $^1\text{H}$ ), carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e DEPT (do inglês “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”), e os espectros bidimensionais de “*Correlation Spectroscopy*” (COSY) e “*Heteronuclear Single Quantum Correlation*” (HSQC) foram obtidos num aparelho Bruker Avance III 40 no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), à temperatura ambiente. Os solventes utilizados foram o dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado e o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). O tetrametilsilano foi usado como padrão interno. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , registados a 400 MHz, indica-se o desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm), o número de protões, a multiplicidade do sinal e a(s) respetiva(s) constante(s) de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registados a 100 MHz, sendo os desvios químicos ( $\delta$ ) indicados em partes por milhão (ppm). Os dados do DEPT, também registados a 100 MHz, encontram-se incluídos nos resultados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (valores de  $\delta$  sublinhados).

Os espectros de massa (EM) foram obtidos a partir de um espectrómetro de massa de impacto eletrónico (IE) Hewlett-Packard 5888A no departamento de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela, sendo referidos os fragmentos mais importantes em  $m/z$  (% relativa) onde  $M^{+}$  corresponde ao ião molecular.

Os pontos de fusão dos compostos finais foram determinados num aparelho *Stuart Scientific* da *Bibby Scientific*.

Na avaliação da atividade antioxidante (métodos do DPPH $^{\cdot}$ , ABTS $^{+}$ , GO $^{\cdot}$  e ferrozina), os compostos foram pesados numa balança *Kern ABS* e a leitura da absorvância envolveu o uso de um leitor de microplacas *BioTek Synergy HT*. Utilizou-se também um banho de ultrassons *Fungilab* para a solubilização dos compostos.

Os estudos eletroquímicos foram realizados no Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP). Usou-se uma balança *Mettler AE240* para a pesagem dos compostos e um banho de ultrassons *VWR*



*USC100TH* durante a preparação das soluções. As medições voltamétricas realizadas com recurso a um potenciostato/galvanostato *Autolab PGSTAT 12 (Metrohm Autlab)* e uma célula eletroquímica com um compartimento. Os voltamogramas foram registados a temperatura ambiente através do uso de três elétrodos (um elétrodo de trabalho de carbono vítreo ( $d = 2\text{ mm}$ ), um de referência de  $[\text{Ag}/\text{AgCl}]$  saturado com KCl e um contra-elétrodo constituído por um fio de platina).

Os estudos em modelo celular foram realizados no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC). A mudança do meio de cultura e a tripsinização realizaram-se numa câmara de fluxo laminar *Herasafe*. As células foram incubadas numa estufa *Hera Cell 150i* humidificada, com 5 % de  $\text{CO}_2$ , a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Durante a tripsinização, a centrifugação foi realizada numa centrífuga *Heraeus megafuge 1.0R*. As pesagens foram efetuadas numa balança *Kern ABS*. No método do MTT utilizou-se um leitor de microplacas *Sunrise<sup>TM</sup>* para a leitura da absorvância.

### 3.6 Métodos gerais de síntese

A proteção e desproteção de grupos funcionais desempenha um papel importante na síntese de derivados de compostos naturais. Na síntese de compostos fenólicos, a proteção do grupo hidroxilo é utilizada para a prevenção de reações laterais com agentes oxidantes ou eletrófilos. Geralmente são utilizados éteres ou ésteres para o efeito, como os éteres de alcóxialquilo representados na fig. 3.1. [79]

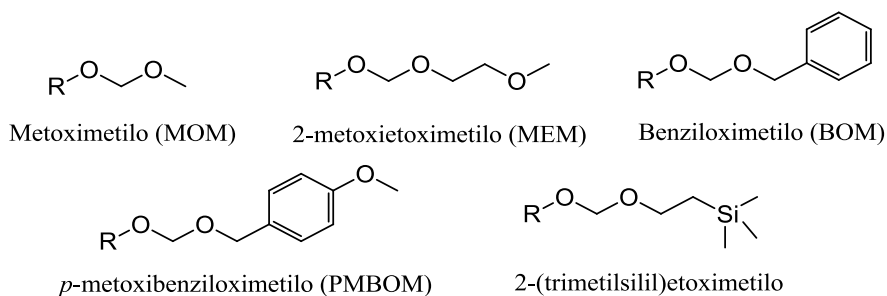


Fig. 3.1: membros principais da família dos éteres de alcóxialquilo.

Neste projeto, a via sintética utilizada para a obtenção dos derivados pretendidos encontra-se esquematizada na fig. 3.2. Após a proteção dos grupos hidroxilo através da sua alquilação com o cloreto de 2-metoxietoximetil (MEMCl) (fig. 3.2, etapa *i*), a reação com crotonato de etilo possibilitou a inserção do espaçador com duas ligações duplas conjugadas de configuração *trans* e com um terminal ácido carboxílico ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ) (fig. 3.2, etapa *ii*). A remoção do grupo protetor (fig. 3.2, etapa *iii*) levou à formação dos compostos livres.

Inicialmente otimizaram-se as condições reacionais para a proteção e desproteção do grupo hidroxilo.

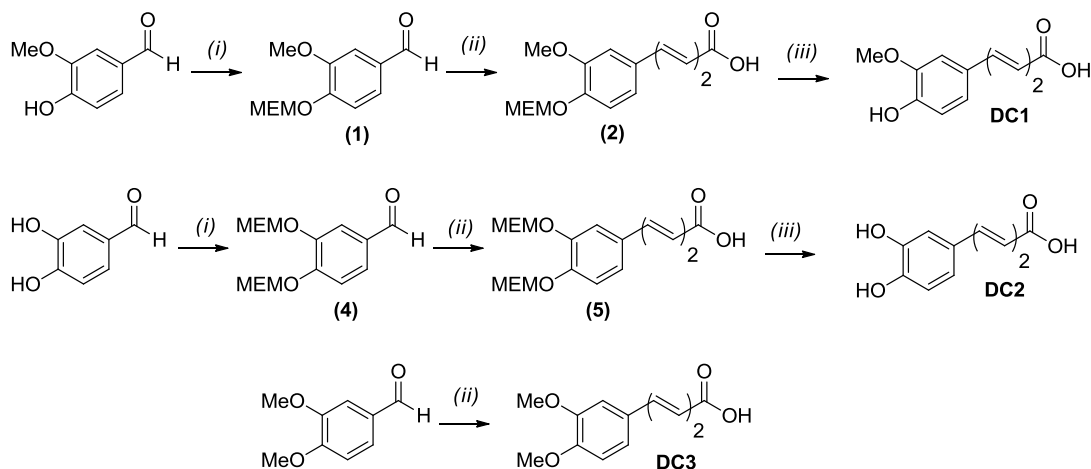


Fig. 3.2: sequência de passos sintéticos realizados para a obtenção de derivados do ácido hidroxicinâmico.

### 3.6.1 Proteção do grupo hidroxilo com éteres de alcoxilalquilo

A introdução do grupo 2-metoxietoximetilo (MEM) deu-se através da reação entre o composto fenólico de partida e o MEMCl, dissolvidos em diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), na presença de diisopropiletilamina (DIPEA) que atua como uma base fraca (fig. 3.3). A adição de iodeto de tetrabutilamónio (TBAI) aumenta a reatividade do agente alquilante.

Esta reação ocorre em maior extensão comparativamente com outras alquilações convencionais, uma vez que os pares de eletrões não compartilhados no oxigénio de éteres do tipo  $\text{RO-CH}_2\text{-X}$  induzem a quebra da ligação com o grupo de saída (X), formando-se um ião oxónio que é capturado pelo grupo hidroxilo. A alquilação ocorre segundo um mecanismo do tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$ . [80]

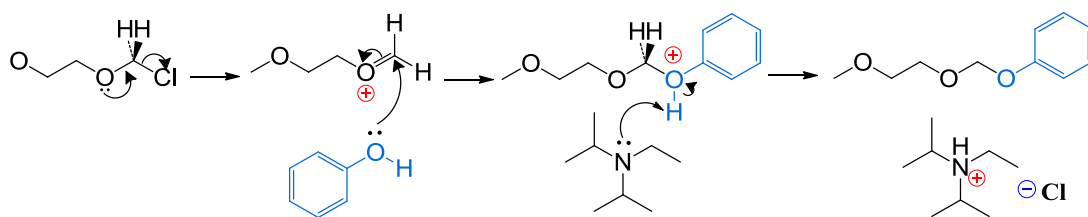


Fig. 3.3: reação de proteção do grupo hidroxilo com o MEMCl.

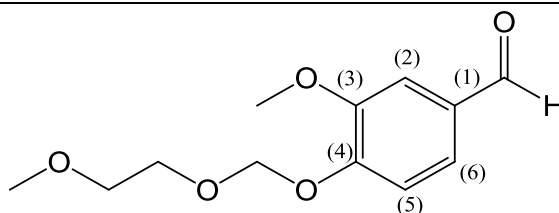
Na otimização do protocolo de proteção testaram-se diferentes condições experimentais para a alquilação do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, nomeadamente a presença/ausência de TBAI, a quantidade relativa de MEMCl e o tempo de reação. Estudou-se ainda a alquilação do 3,4-di-hidroxibenzaldeído de modo a avaliar a proteção de dois grupos hidroxilo na mesma molécula.

### 3.6.1.1 Otimização do protocolo de proteção de fenóis

O protocolo de proteção utilizado foi adaptado a partir dos dados disponíveis na literatura [80, 81], tendo sido avaliadas algumas alterações. Num balão reacional de 100 mL contendo o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (0,10 g; 0,66 mmol) e o TBAI dissolvidos em diclorometano (2,5 mL) adicionou-se, com agitação e arrefecimento, o DIPEA (235  $\mu$ L; 1,31 mmol) e o MEMCI de acordo com os dados da tabela 3.1. A mistura permaneceu em agitação a 0°C durante 3h e, passado o tempo de reação, adicionaram-se 30 mL de H<sub>2</sub>O (30 mL) e efetuou-se a extração com diclorometano (3×10 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 5 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. Para a purificação do produto, realizou-se uma cromatografia em coluna em gel de sílica (acetato de etilo/n-hexano (1:3), aumentando depois a polaridade para acetato de etilo/n-hexano (1:1) e, mais tarde, para acetato de etilo/n-hexano (3:1)), sendo as frações controladas por CCF (gel de sílica, acetato de etilo/n-hexano (1:3)) e reunidas consoante o seu perfil cromatográfico. O controlo analítico por CCF (acetato de etilo/diclorometano (3:7)) revelou que o produto continuava impuro. Realizou-se outra cromatografia em coluna em gel de sílica (acetato de etilo/diclorometano (3:7)) e, após a evaporação do solvente que continha o composto desejado, obteve-se um óleo incolor.

Tabela 3.1: condições avaliadas na proteção do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído. Abreviaturas: TBAI – iodeto de tetrabutilamónio; MEMCI – cloreto de 2-metoxietoximetilo; MEM-R – produto protegido.

$m_{\text{TBAI}}/\text{mg}$	$V_{\text{MEMCI}}/\mu\text{L}$	t/h	$m_{\text{MEM-R}}/\text{g}$	$\eta/\%$
0	113	3	0,08	49,0
13	113	3	0,13	78,3
14	150	3	0,13	78,8
12	113	24	0,13	78,0



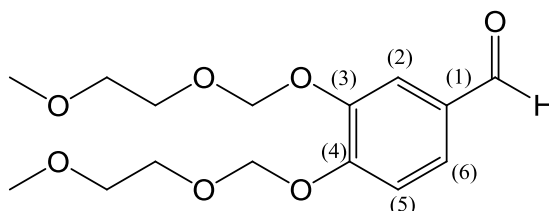
**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 3,36 (s, 3H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,56 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,88 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,42 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 7,32 (d, J=8,7 Hz, 1H, H(5)), 7,43 (m, 2H, H(2), H(6)), 9,87 (s, 1H, CHO).

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 55,93 (OCH<sub>3</sub>), 58,88 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 68,17 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 71,38 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 93,93 (OCH<sub>2</sub>O), 109,53 (C(2)), 114,82 (C(5)), 126,30 (C(6)), 131,07 (C(1)), 150,03 (C(3)), 151,92 (C(4)), 190,89 (CHO).

Atendendo aos rendimentos obtidos, as proteções dos grupos hidroxilo foram realizadas de acordo com o protocolo geral seguinte: num balão reacional de 100 mL contendo o fenol (1,0 mmol) e TBAI (0,05 mmol por cada grupo OH) dissolvidos em diclorometano adicionaram-se, com agitação e arrefecimento, o DIPEA (2,0 mmol por cada grupo OH) e o MEMCl (1,5 mmol por cada grupo OH). A mistura permaneceu em agitação a 0°C durante 3-4h e, passado o tempo de reação, adicionaram-se 30 mL de H<sub>2</sub>O e efetuou-se a extração com diclorometano (3×10mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 5 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (acetato de etilo/diclorometano (3:7)), evaporando-se o solvente das frações com o produto pretendido. O progresso da reação e as frações da cromatografia foram avaliados por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).

As condições adotadas foram primeiramente utilizadas na proteção do 3,4-bis-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído para avaliar a proteção de dois grupos hidroxilo presentes na mesma molécula. As quantidades utilizadas foram as seguintes: 3,4-dihidroxibenzaldeído (0,25 g; 1,85 mmol), TBAI (0,07 g, 0,18 mmol), diclorometano (7 mL), DIPEA (1,30 mL; 7,27 mmol) e o MEMCl (620 µL; 5,43 mmol). Após a concentração das frações com o composto desejado, obteve-se um óleo amarelado (0,39 g; 1,2 mmol).

**Rendimento:** 67,6%



**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ (ppm) = 3,37 (s, 3H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,38 (s, 3H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,56 (m, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3,87 (m, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 5,37 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5,41 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 7,33 (d, J=8,4 Hz, 1H, H(5)), 7,52 (dd, J=1,9 Hz, 8,4 Hz, 1H, H(6)), 7,71 (d, J=1,9 Hz, 1H, H(2)), 9,87 (s, 1H, CHO).

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ (ppm) = 59,95 (OCH<sub>3</sub>), 59,98 (OCH<sub>3</sub>), 69,08 (OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 69,15 (OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 72,35 (OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 72,40 (OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 94,87 (OCH<sub>2</sub>O), 95,36 (OCH<sub>2</sub>O), 116,38 (C(2)), 117,34 (C(5)), 127,10 (C(6)), 132,08 (C(1)), 143,29 (C(3)), 153,53 (C(4)), 192,74 (CHO).

### 3.6.1.1.1 Síntese do 3-metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído (composto 1)

O composto 1 foi obtido a partir do protocolo geral de proteção de fenóis nas seguintes condições: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (0,50 g; 3,3 mmol), diclorometano (15 mL), DIPEA (1174  $\mu$ L; 6,57 mmol), MEMCl (563  $\mu$ L; 6,57 mmol) e TBAI (0,06 g, 0,16 mmol).

**Rendimento:** 92,4%

### 3.6.1.1.2 Síntese do 3,4-bis((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído (composto 4)

O composto 4 foi obtido a partir do protocolo geral de proteção de fenóis nas seguintes condições: 3,4-di-hidroxibenzaldeído (1,00 g; 7,3 mmol), diclorometano (25 mL), DIPEA (5,17 mL; 29,1 mmol), MEMCl (2,48 mL; 21,8 mmol) e TBAI (0,27g; 0,73 mmol).

**Rendimento:** 84,0%

## 3.6.2 Reação de introdução do espaçador

A introdução do espaçador com as duas ligações duplas resultou da reação do aldeído com o crotonato de etilo em *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) na presença de uma base forte e volumosa (terc-butóxido de potássio) (fig. 3.4).

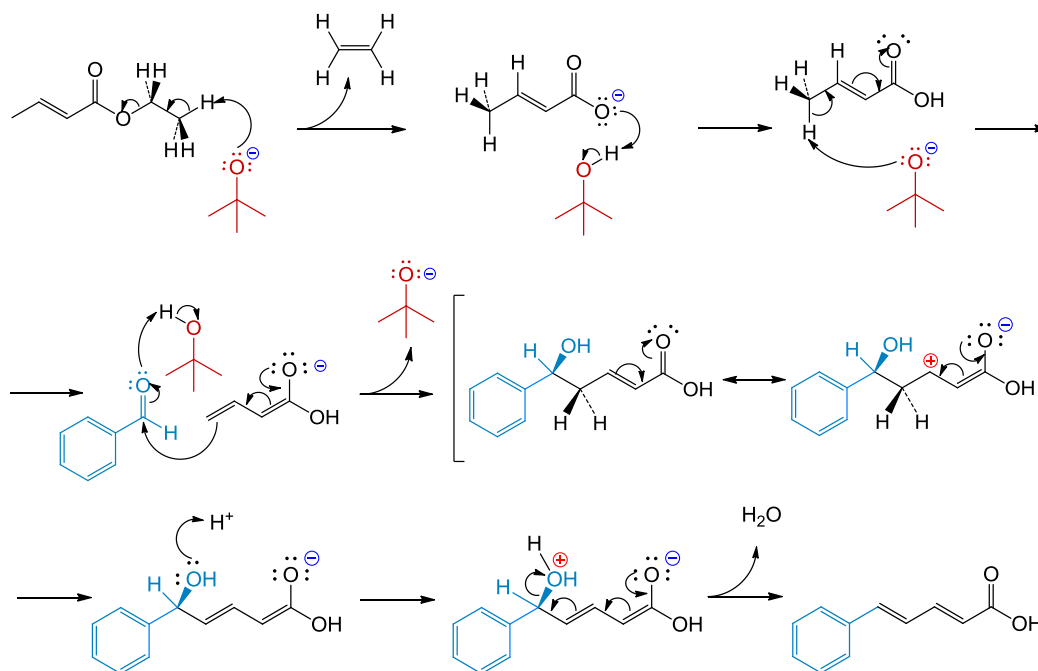


Fig. 3.4: reação de elongação do aldeído.

### 3.6.2.1 Procedimento geral

Num balão reacional de 100 mL contendo o aldeído (1 mmol) e o terc-butóxido de potássio (1,2 mmol) dissolvidos em NMP (1,3 mL) adicionou-se, com agitação, o crotonato de etilo (1,34 mmol). A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante a noite. A purificação por extração seguida de cromatografia em coluna e/ou recristalização permitiu a obtenção do produto puro. As condições utilizadas na reação de elongação foram retiradas e adaptadas da literatura [82].

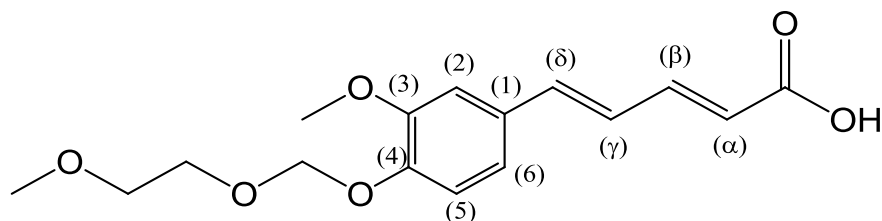
#### 3.6.2.1.1 Síntese do ácido 3-metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)cinamilidenoacético (composto 2)

O composto 2 foi obtido a partir do protocolo geral de introdução do espaçador nas seguintes condições: composto 1 (0,73 g; 3,0 mmol), NMP (4 mL), crotonato de etilo (514  $\mu$ L; 4,1 mmol) e terc-butóxido de potássio (0,43 g; 3,8 mmol).

Após a adição de 10 mL de diclorometano, o produto foi transferido para uma ampola de decantação de 250 mL e extraído com solução aquosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (4 $\times$ 10mL). As fases aquosas reunidas foram neutralizadas a 0°C com HCl 1M e extraídas com diclorometano (4 $\times$ 10mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 10 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (acetato de etilo/diclorometano (3:7)), evaporando-se o solvente das frações com o produto pretendido. A recristalização numa mistura de diclorometano/*n*-hexano levou à obtenção de um pó amarelo-esverdeado (0,53 g, 1,7 mmol).

O progresso da reação e as frações da cromatografia foram avaliados por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).

**Rendimento:** 56,1%



**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ (ppm) = 3,37 (s, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 3,56 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 3,87 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 3,92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,34 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ),

5,71 (d,  $J=11,1$  Hz, 1H, H $\delta$ ), 6,84 (m, 2H, H $\alpha$ , H $\gamma$ ), 7,06 (m, 2H, H(2), H(6)), 7,19 (d,  $J=8,9$  Hz, 1H, H(5)), 7,97 (ddd,  $J=1,0$  Hz, 11,3 Hz, 14,6 Hz, 1H, H $\beta$ ), 9,87 (s, 1H, CHO).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 56,02 ( $\text{OCH}_3$ ), 59,03 ( $(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 67,96 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 71,54 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 94,29 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 110,15 (C(2)), 115,35 (C(5)), 116,09 (C $\delta$ ), 121,64 (C(6)), 123,49 (C $\beta$ ), 130,71 (C(1)), 142,40 (C $\alpha$ ), 147,33 (C $\gamma$ ), 147,83 (C(3)), 149,82 (C(4)), 170,72 (COOH).

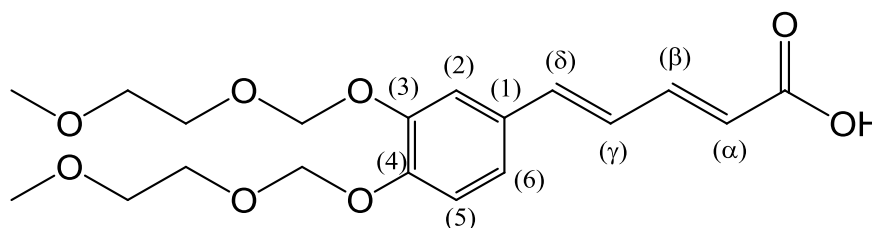
#### 3.6.2.1.2 Síntese do ácido 3,4-bis-((2-metoxietoxi)metoxi)cinamilidenoacético (composto 5)

O composto 5 foi obtido a partir do protocolo geral de introdução do espaçador nas seguintes condições: composto 4 (1,67 g; 5,3 mmol), NMP (7 mL), crotonato de etilo (896  $\mu\text{L}$ ; 7,1 mmol) e terc-butóxido de potássio (0,72 g; 6,38 mmol). Após a adição de 45 mL de diclorometano (fase orgânica 1), a mistura reacional foi transferida para uma ampola de decantação de 250 mL e extraída com solução aquosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 $\times$ 20 mL). A fase aquosa foi neutralizada com HCl 1M e extraída com acetato de etilo (3 $\times$ 30 mL) (fase orgânica 2). A análise por CCF demonstrou que as proporções de composto e de impurezas eram diferentes nas fases orgânicas 1 e 2, efetuando-se em separado a lavagem com 10 mL de salmoura, desidratação com sulfato de sódio anidro, filtração e concentração.

Os produtos brutos foram purificados por cromatografia em coluna em gel de sílica (acetato de etilo/diclorometano (3:7), aumentando depois a polaridade para acetato de etilo/diclorometano/metanol (3:7:0,25)), evaporando-se posteriormente o solvente das frações com o produto pretendido. A recristalização num sistema de diclorometano/éter de petróleo possibilitou a obtenção de cristais amarelos em forma de agulha (1,18 g; 3,1 mmol).

O progresso da reação e as frações da cromatografia foram avaliados por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).

**Rendimento:** 58,1%



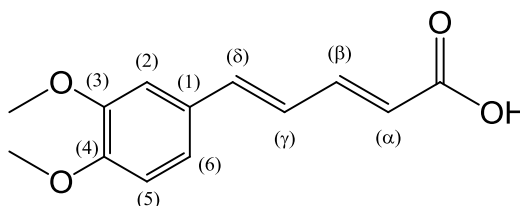
**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 3,40 (s, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 3,41 (s, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 3,58 (m, 4H,  $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 3,87 (m, 4H,  $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 5,32 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5,33 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5,72 (d,  $J=11,3$  Hz, 1H, H $\delta$ ), 6,74 (m, 2H, H $\alpha$ , H $\gamma$ ), 7,18 (m, 2H, H(5), H(6)), 7,31 (d,  $J=1,2$  Hz, 1H, H(2)), 8,00 (ddd,  $J=1,0$  Hz, 11,4 Hz, 14,6 Hz, 1H, H $\beta$ ).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 59,04 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 59,05 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ ), 67,97 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 68,00 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 71,55 ( $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 94,26 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 94,74 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 115,74 (C(2)), 116,56 (C(5)), 116,59 (C $\delta$ ), 122,28 (C(6)), 123,88 (C $\beta$ ), 130,93 (C(1)), 142,04 (C $\alpha$ ), 147,15 (C $\gamma$ ), 147,29 (C(3)), 148,45 (C(4)), 170,93 (COOH).

#### 3.6.2.1.3 Síntese do ácido 3,4-dimetoxicinamilidenoacético (DC3)

O composto DC3 foi obtido a partir do protocolo geral de introdução do espaçador nas seguintes condições: 3,4-dimetoxibenzaldeído (1,01 g; 6,1 mmol), NMP (5 mL), crotonato de etilo (1 mL; 8,0 mmol) e terc-butóxido de potássio (0,80 g; 7,1 mmol). Passado o tempo de reação, a mistura foi neutralizada com HCl 1M em gelo e extraída com diclorometano ( $3 \times 10$  mL). A fase orgânica foi extraída com NaOH 2M ( $3 \times 10$  mL) e a fase aquosa resultante foi neutralizada com HCl 1M em gelo. O sólido amarelo formado foi separado por filtração (1,0 g; 4,4 mmol). O progresso da reação foi avaliado por CCF em acetato de etilo.

**Rendimento:** 72,9%



**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}$ , 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 3,79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5,65 (d,  $J=11,2$  Hz, 1H, H $\delta$ ), 6,80 (t,  $J=11,32$ , 1H, H $\gamma$ ), 6,91 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 6,98 (d,  $J=8,2$  Hz, 1H, H(5)), 7,09 (m, 2H, H(2), H(6)), 7,88 (dd,  $J=11,5$  Hz, 15,7 Hz, 1H, H $\beta$ ), 12,22 (s, 1H, COOH).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}$ , 100 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 55,93 ( $\text{OCH}_3$ ), 56,02 ( $\text{OCH}_3$ ), 110,5 (C(2)), 112,41 (C(5)), 117,69 (C $\delta$ ), 121,16 (C(6)), 123,14 (C $\beta$ ), 129,40 (C(1)), 141,39 (C $\alpha$ ), 145,02 (C $\gamma$ ), 149,40 (C(3)), 150,39 (C(4)), 167,89 (COOH).



**EM/IE  $m/z$  (%):** 233,9 ( $M^+$ , 81), 189,0 (100), 173,9 (30), 158,0 (29), 145,0 (11), 127,0 (9), 115,0 (31), 103,0 (18), 91,0 (8), 77,0 (14), 63,0 (5).

**Ponto de fusão:** [137-141] °C.

### 3.6.3 Desproteção do grupo hidroxilo

A clivagem do grupo protetor requer o uso de condições reacionais ácidas. [83] Neste projeto, a desproteção dos fenóis envolveu a adição de uma resina de poliestireno que contém grupos ácido sulfônico (*Amberlyst® 15*) após a solubilização do produto protegido numa mistura metanol/água (fig. 3.5). [84, 85] A *Amberlyst® 15* é uma resina relativamente barata e reutilizável, tornando o seu uso sustentável em termos económicos e ambientais. Além disso, esta resina possui estabilidade física e química, podendo ser usada durante um período de tempo prolongado, não sendo tóxica nem corrosiva. [85]

Na otimização do protocolo de desproteção avaliou-se o efeito da quantidade de resina *Amberlyst® 15 hydrogen form*, do tempo e da temperatura reacionais. De modo análogo à proteção, efetuou-se a desproteção do 3,4-bis((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído nas condições adotadas.

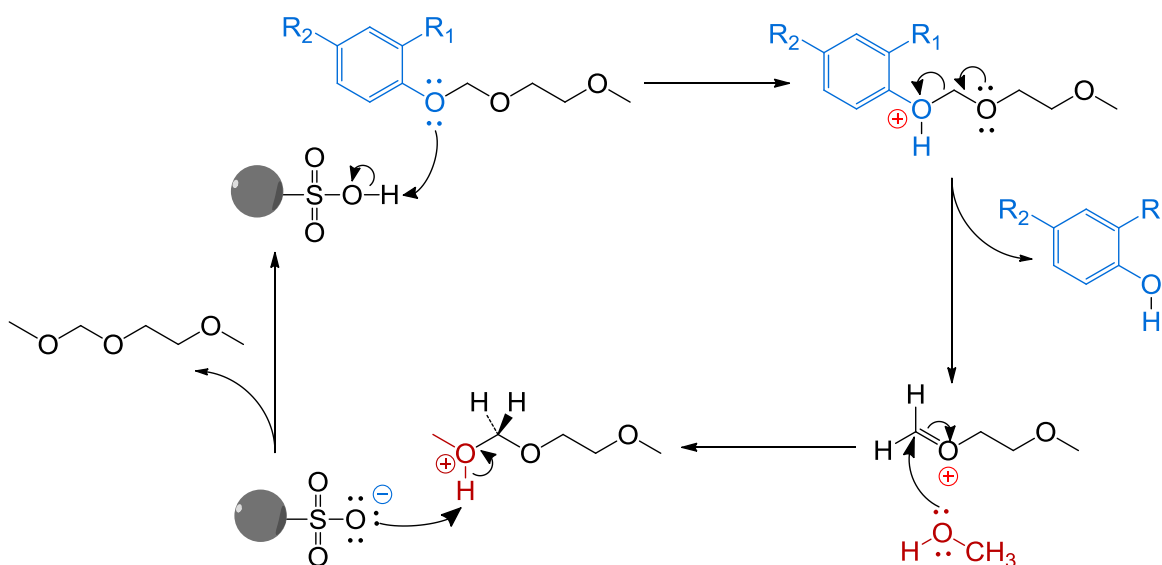


Fig. 3.5: reação de desproteção do grupo hidroxilo com a resina *Amberlyst® 15*.

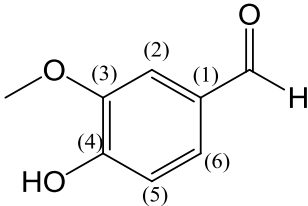
#### 3.6.3.1 Otimização do protocolo de desproteção de fenóis

O protocolo de desproteção utilizado neste projeto foi adaptado da literatura [84], tendo-se avaliado algumas alterações. Num balão reacional de 100 mL contendo o 3-

metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído dissolvido em metanol/água (v/v, 95:5) (10 mL) adicionou-se, com agitação, a resina *Amberlyst® 15 (hydrogen form, strong acidic cation exchanger, dry, Sigma®)*. As quantidades de produto protegido e de resina, assim como as condições de tempo e temperatura, estão descritas na tabela 3.2. Passado o tempo de reação, a mistura foi filtrada com o auxílio da pressão reduzida. Após a evaporação do metanol e a adição de 25 mL de água extraiu-se fase aquosa com 3×10 mL de diclorometano. As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 5 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. Após recristalização, utilizando uma mistura de diclorometano/*n*-hexano, obtiveram-se cristais brancos em forma de agulha.

Tabela 3.2: condições avaliadas para a remoção do grupo protetor do 3-metoxi-4-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído. Abreviaturas: MEM-R – produto protegido; R-OH – fenol livre.

m <sub>MEM-R</sub> /g	n <sub>MEM-R</sub> /mmol	m <sub>resina</sub> /mg	t/h	T/°C	m <sub>R-OH</sub> /g	η/%
0,13	0,53	0,0061	1	40	—	—
0,13	0,54	0,0544	3	40	—	—
0,13	0,55	0,5489	7	50	0,05	60,1
0,10	0,40	0,4032	7	40	0,03	55,9

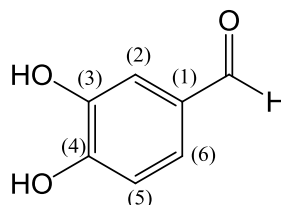


**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ (ppm) = 3,98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7,04 (d, *J*=8,5 Hz, 1H, H(5)), 7,42 (m, 2H, H(2), H(6)); 9,83 (s, 1H, CHO).

Atendendo aos rendimentos obtidos, as desproteções dos grupos hidroxilo foram realizadas de acordo com o protocolo geral seguinte: num balão reacional de 100 mL dissolveu-se o produto protegido com o grupo MEM numa mistura de metanol/água (v/v, 95:5) e adicionou-se a resina *Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, dry* (1 g por mmol de produto protegido). A mistura permaneceu em agitação a 40 °C protegida da luz. Passado o tempo de reação, filtrou-se a mistura para remover a resina e evaporou-se o metanol. A purificação do produto desprotegido envolveu a filtração após acidificação do sistema com HCl 1M a 0 °C ou a extração líquido-líquido seguida de recristalização.

As condições adotadas foram primeiramente utilizadas na desproteção do 3,4-bis-((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldeído para avaliar a desproteção simultânea de dois grupos hidroxilo presentes na mesma molécula. As quantidades utilizadas foram as seguintes: produto protegido (0,39 g; 1,25 mmol), mistura de metanol/água (v/v, 95:5) (25 mL) e resina *Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, dry* (1,25 g). A mistura permaneceu em agitação a 40°C durante 6h e à temperatura ambiente durante a noite. Após filtração, evaporação do metanol e adição de 25 mL de água, extraiu-se a fase aquosa com 3x10 mL de acetato de etilo. As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 5 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. A recristalização numa mistura de acetato de etilo/*n*-hexano permitiu a obtenção de um pó de cor castanha (0,12 g; 0,85 mmol).

**Rendimento:** 68,0%

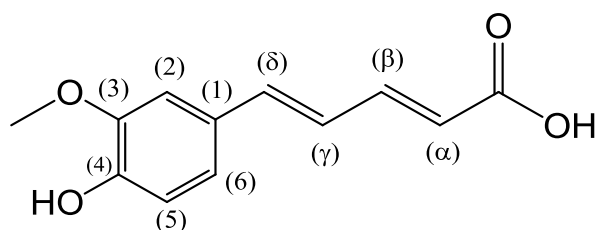


**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 6,89 (d,  $J=8,0$  Hz, 1H, H(5)), 7,23 (d,  $J=1,9$  Hz, 1H, H(2)), 7,26 (dd,  $J=2,0$  Hz, 8,1 Hz, H(6)), 9,70 (s, 1H, CHO).

#### 3.6.3.1.1 Síntese do ácido 4-hidroxi-3-metoxicinamilidenoacético (composto DC1)

O composto DC1 foi obtido a partir do protocolo geral de desproteção de fenóis nas seguintes condições: composto 5 (0,53 g, 1,7 mmol), metanol/água (v/v, 95:5) (35 mL) e resina *Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, dry* (1,7 g). A mistura permaneceu em agitação a 40° C durante 7 h e a temperatura ambiente durante a noite. Após a evaporação do metanol, adicionaram-se 45 mL de água. A fase aquosa foi neutralizada com HCl 1M, transferida para um balão de decantação de 250 mL e extraída com diclorometano (3x15 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com 5 mL de salmoura, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. Após a purificação do sólido formado na fase aquosa, por filtração com pressão reduzida, e do produto bruto obtido da fase orgânica, por cromatografia em coluna em gel de sílica, ((acetato de etilo/diclorometano (3:17) até (3:7)) obteve-se um pó amarelo (0,09 g, 0,40 mmol). O progresso da reação e as frações da cromatografia foram avaliados por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).

**Rendimento:** 23,5%



**RMN de <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz):** δ (ppm) = 3,80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,60 (d, J=11,2 Hz, 1H, H<sub>δ</sub>), 6,78 (t, J=11,5 Hz, 1H, H<sub>γ</sub>), 6,87 (d, J=15,7 Hz, 1H, H<sub>α</sub>), 6,82 (d, J=8,1 Hz, 1H, H(5)), 6,99 (dd, J=1,7 Hz, 8,1 Hz, 1H, H(6)), 7,04 (d, J=1,7 Hz, 1H, H(2)) , 7,97 (dd, J=11,7 Hz, 15,7 Hz, 1H, H<sub>β</sub>), 9,43 (s, 1H, OH), 12,16 (s, 1H, COOH).

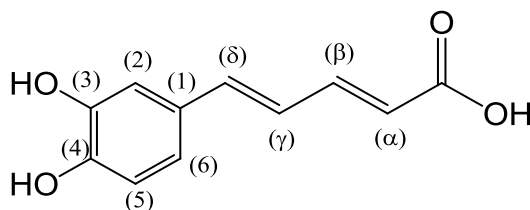
**RMN de <sup>13</sup>C (DMSO, 100 MHz):** δ (ppm) = 56,05 (OCH<sub>3</sub>), 111,36 (C(2)), 116,34 (C(5)), 117,11 (C<sub>δ</sub>), 121,39 (C(6)), 122,32 (C<sub>β</sub>), 128,11 (C(1)), 141,84 (C<sub>α</sub>), 145,28 (C<sub>γ</sub>), 148,31 (C(3)), 148,59 (C(4)), 167,95 (COOH).

**EI/MS m/z (%):** 219,9 (M<sup>+</sup>,100), 202,9 (8), 186,9 (5), 174,9 (97), 159,9 (57), 142,9 (51), 130,9 (49), 115,0 (96), 109,9 (9), 103,0 (33), 89,0 (14), 77,0 (37), 65,1 (14), 55,0 (12).

**Ponto de fusão:** [184-185] °C

#### 3.6.3.1.2 Síntese do ácido 3,4-di-hidroxicinamilidenoacético (composto DC2)

O composto DC2 foi obtido a partir do protocolo geral de desproteção de fenóis nas seguintes condições: composto 5 (0,39 g; 1,1 mmol), metanol/água (v/v, 95:5) (20 mL) e resina *Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, dry* (1,0 g). A mistura permaneceu em agitação, ao abrigo da luz, a 40 °C durante 8 h e a temperatura ambiente durante a noite. Após filtração, evaporação do metanol e adição de 30 mL de acetato de etilo, transferiu-se o meio reacional para uma ampola de decantação de 250 mL e efetuou-se a lavagem com HCl 1M (10 mL) e água (3×10 mL). A fase orgânica foi lavada com 5 mL de salmoura, desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. A recristalização em diclorometano possibilitou a obtenção de um pó amarelo (0,022 g; 0,11 mmol). O progresso da reação foi avaliado por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).



**Rendimento:** 10,6%

**RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 5,58 (d,  $J=11,1$  Hz, 1H, H $\delta$ ), 6,77 (m, 4H, H(5), H $\gamma$ , H(6), H $\alpha$ ), 6,98 (d,  $J=1,9$  Hz, 1H, H(2)), 7,79 (ddd,  $J=0,8$  Hz, 11,5 Hz, 15,6 Hz, 1H, H $\beta$ ), 9,37 (s, 2H, 2 $\times$ OH).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO, 100 MHz):**  $\delta$ (ppm) = 113,66 (C(2)), 116,35 (C(5)), 116,97 (C $\delta$ ), 120,77 (C(6)), 122,04 (C $\beta$ ), 128,14 (C(1)), 141,78 (C $\alpha$ ), 145,25 (C $\gamma$ ), 146,11 (C(3)), 147,64 (C(4)), 168,12 (COOH).

**EM/IE  $m/z$  (%):** 205,9 ( $\text{M}^+$ , 68), 160,9 (100), 142,9 (23), 132,0 (10), 115,0 (53), 103,0 (9), 89,0 (9), 77,0 (8), 59,0 (4).

**Ponto de fusão:** [174-175]  $^{\circ}\text{C}$

A massa obtida de composto DC2 foi insuficiente para a realização dos ensaios seguintes. Neste contexto, testaram-se novas condições reacionais de forma a aumentar o rendimento da reação, nomeadamente a troca de resina, usando-se a *Amberlyst® 15 hydrogen form, wet*, e a alteração das proporções de metanol e água.

#### Protocolo alternativo nº1

Num balão reacional de 100 mL dissolveu-se o composto 5 (0,79 g; 2,1 mmol) numa mistura de metanol/água (v/v, 95:5) (40 mL) e adicionou-se a resina *Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, wet* (2,1 g). Posteriormente, efetuaram-se adições de 4,2 g, 4,0 g e 6,1 g após 1 h, 2 h e 3 h de reação, respetivamente. A mistura permaneceu em agitação, ao abrigo da luz, durante 50 h, a 40  $^{\circ}\text{C}$  durante o dia e a temperatura ambiente durante a noite. Após filtração e evaporação do metanol adicionaram-se 5 mL de HCl 1M a 0  $^{\circ}\text{C}$ . O precipitado amarelo que se formou foi filtrado por gravidade e lavado com água desionizada. O progresso da reação foi avaliado por CCF num sistema de diclorometano/metanol (9:1).

**Rendimento:** 10,7%

### Protocolo alternativo nº2

Num balão reacional de 100 mL dissolveu-se o composto 5 (0,38 g; 1,0 mmol) numa mistura de metanol/água (v/v, 7:3) (20 mL) e adicionou-se a resina Amberlyst® 15 hydrogen form, strong acidic cation exchanger, wet (1,03g). Efetuaram-se adições de 0,5 g, 1,1 g, 2,0 g, 2,0 g, 4,1 g e 5,2 g após 2h e de hora a hora entre as 20h e as 24h de reação. A mistura permaneceu em agitação, ao abrigo da luz, durante 48 h, a 40 °C durante o dia e a temperatura ambiente durante a noite. Após filtração, evaporação do metanol, adição de 30 mL de água desionizada e acidificação da fase aquosa com HCl 1M, o produto bruto foi transferido para uma ampola de decantação de 250 mL e extraído com 3×15 mL de acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada com 10 mL de salmoura, desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. A recristalização com acetato de etilo possibilitou a obtenção de um pó amarelo (0,025 g; 0,12 mmol). O progresso da reação foi avaliado por CCF num sistema de acetato de etilo/diclorometano (3:7).

**Rendimento:** 12,3 %

## 3.7 Avaliação da atividade antioxidante

Como foi referido anteriormente, a atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com a sua capacidade de neutralização de radicais livres e/ou de prevenção da sua formação através da quelatação de metais de transição.

A aplicabilidade do conceito de atividade antioxidante em áreas como a biologia, medicina e nutrição (como a redução ou prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo e a estabilização de alimentos durante o processamento ou armazenamento) impulsionou o desenvolvimento de várias metodologias para a sua avaliação isoladamente ou em extratos naturais. [86, 87]

### 3.7.1 Neutralização de radicais livres

Neste trabalho recorreu-se ao uso dos métodos de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e GO<sup>•</sup> para a avaliação da neutralização de radicais pelos compostos sintetizados (DC1, DC2 e DC3) e de compostos de referência (trolox (TRX) e os ácidos ferúlico (FER) e cafeico (CAF)) (fig. 3.6). Estes ensaios baseiam-se no mesmo princípio: após a obtenção de um radical

sintético com cor, monitoriza-se a sua neutralização pela amostra por espectrofotometria. [87]

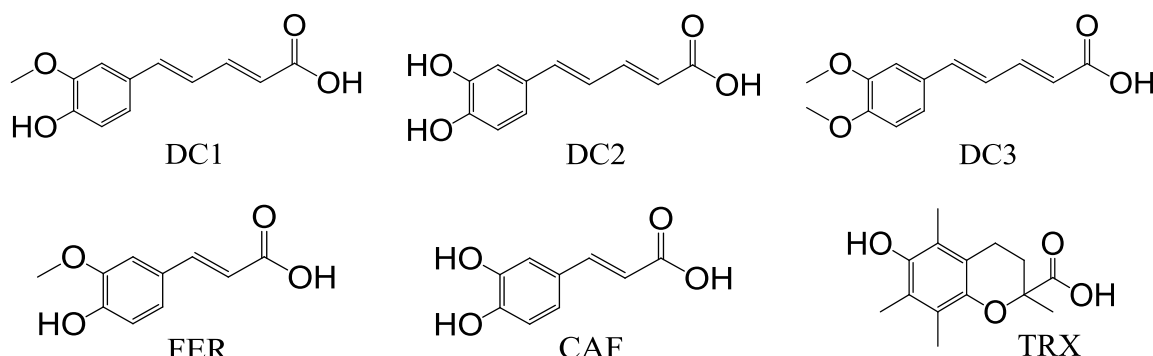


Fig. 3.6: estrutura química dos compostos avaliados pelos métodos de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e GO<sup>•</sup>. Abreviaturas: TRX: trolox, FER: ácido ferúlico; CAF: ácido cafeico.

A capacidade de neutralização do radical foi expressa % inibição e calculada usando a equação 3.1, onde Abs<sub>controlo</sub> é a absorvância da solução de radical em etanol, Abs<sub>branco</sub> é a absorvância do etanol sem a presença do radical e Abs<sub>amostra</sub> é a absorvância da solução de radical na presença dos potenciais antioxidantes.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs}_{\text{controlo}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{(\text{Abs}_{\text{controlo}} - \text{Abs}_{\text{branco}})} \times 100 \quad (3.1)$$

A representação da % inibição em função das concentrações de antioxidante usadas permitiu a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração de antioxidante necessária para neutralizar 50% do radical).

#### 3.7.1.1 Método do DPPH<sup>•</sup>

O método do DPPH<sup>•</sup> é um ensaio colorimétrico idealizado por Blois para demonstrar a capacidade do DPPH<sup>•</sup> aceitar átomos de hidrogénio provenientes da cisteína. Cerca de três décadas depois, este ensaio foi adotado para a caracterização da atividade antioxidante. [88].

O DPPH<sup>•</sup> é um radical orgânico de azoto estável disponível comercialmente. A sua redução a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) por antioxidantes dadores de átomos de hidrogénio (AH) é acompanhada pela alteração da cor púrpura para amarelo com a concomitante diminuição da absorvância entre os 515 e 520 nm (fig. 3.7). A análise é simples, sensível e bastante rápida, sendo por isso muito utilizada na avaliação da atividade antioxidante. [88, 89, 90]

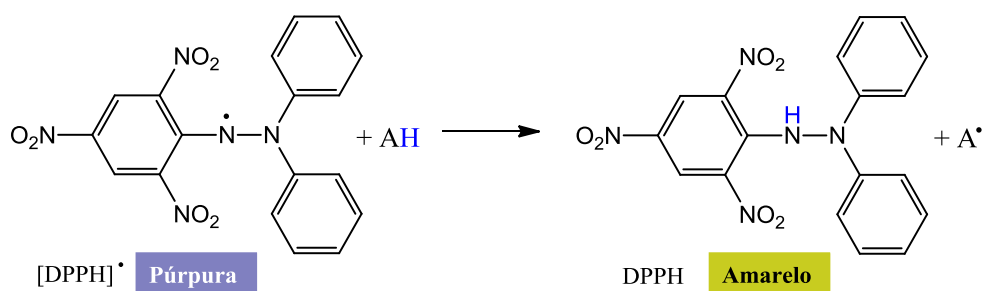


Fig. 3.7: reação de neutralização do radical DPPH<sup>•</sup> por um antioxidante dador de átomos de hidrogénio (AH).

### 3.7.1.1.1 Procedimento experimental

Preparou-se uma solução etanólica do radical DPPH<sup>•</sup> (6,85 mM, 5 mL) que foi sujeita a sonicação a 40° C durante 10 minutos para facilitar a dissolução. Efetuou-se a sua diluição em etanol até à obtenção de uma absorvância próxima de  $\pm 0,72$ , num comprimento de onda de 515 nm.

Prepararam-se soluções etanólicas dos compostos DC1, DC2, DC3, FER, CAF e TRX (5 mM; 2 mL). Diluíram-se 400  $\mu$ L destas soluções em 1600  $\mu$ L de etanol (1 mM, 2 mL) e, efetuaram-se de seguida várias diluições em eppendorfs de 1,5 mL de modo a obter concentrações crescentes de composto (tabela 3.3).

**Tabela 3.3:** registo dos volumes de solução de composto 1 mM ( $V_{X\ 1mM}$ ) e de etanol ( $V_{etanol}$ ) para a preparação de soluções com concentração crescente ( $c_{dil}$ ).

$V_{X\ 1mM}/\mu L$	10	50	100	175	350	500	750
$V_{etanol}/\mu L$	990	950	900	825	650	500	250
$c_{dil}/\mu M$	10	50	100	175	350	500	750

Em cada poço de uma microplaca pipetaram-se 20  $\mu$ L de cada solução etanólica do composto e 180  $\mu$ L da solução de radical DPPH<sup>•</sup> diluída. Portanto, cada solução foi diluída 10 vezes na microplaca, obtendo-se concentrações de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 17,5  $\mu$ M, 35  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 75  $\mu$ M. Preparou-se também um ensaio controlo (20  $\mu$ L de etanol e 180  $\mu$ L da solução de radical DPPH<sup>•</sup> diluída), correspondente a 100% de radical, e o branco (200  $\mu$ L de etanol). Todas as aplicações na microplaca foram realizadas em triplicado.

Efetuaram-se leituras espectrofotométricas, num leitor de microplacas, num comprimento de onda de 515 nm durante 45 minutos, com intervalos de 1 minuto. A determinação do IC<sub>50</sub> envolveu o uso da leitura registada aos 45 minutos. Os valores de IC<sub>50</sub> correspondem à média de 3 leituras  $\pm$  desvio padrão.



O procedimento foi adaptado da literatura [71].

### 3.7.1.2 Método do $\text{ABTS}^{\bullet+}$

O método do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  baseia-se na formação do cromóforo azul-esverdeado  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e posterior redução a ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) por um antioxidante. Esta redução é monitorizada através da diminuição da absorvância aos 734 nm e depende da duração da reação, da atividade intrínseca do antioxidante e da concentração na amostra. [91]

No método original desenvolvido por Miller, a formação do catião radicalar  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  era efetuada através da ativação da metmioglobina com  $\text{H}_2\text{O}_2$ : desta reação forma-se o radical ferrilmioglobina responsável pela oxidação do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Mais tarde, foi introduzida uma alteração nesta metodologia, na qual o radical era gerado através do uso de persulfato de potássio (fig. 3.8). [91, 92]

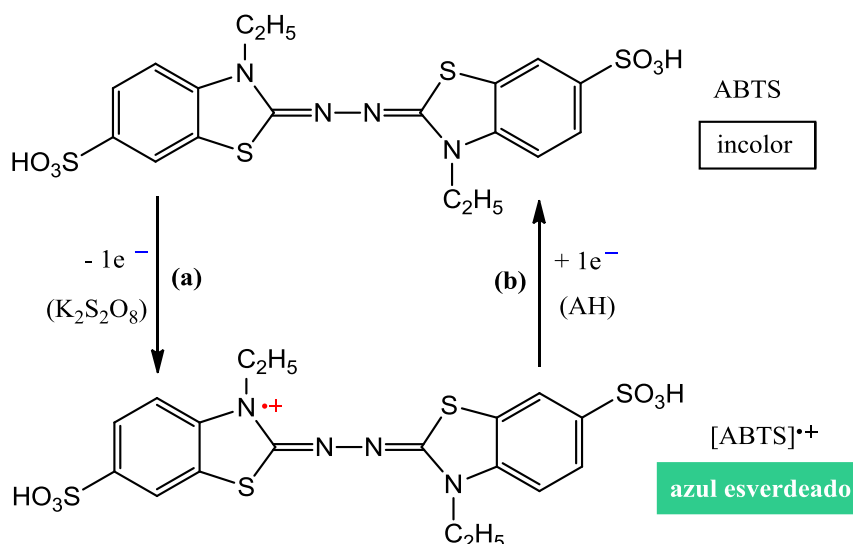


Fig. 3.8: (a) formação do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  através da oxidação do ABTS pelo  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e (b) Neutralização do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pelo antioxidante AH.

#### 3.7.1.2.1 Procedimento experimental

Prepararam-se soluções aquosas de ABTS (7 mM, 10,00 mL) e de persulfato de potássio (150 mM, 1 mL). A adição de 163  $\mu\text{L}$  da segunda solução à primeira, seguido de um período de armazenamento de 16 h ao abrigo da luz, permitiu obter a solução do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a 7 mM. Antes da sua utilização, a solução do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi sujeita a sonicação a  $40^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para facilitar a dissolução. Efetuou-se a sua

diluição em etanol até à obtenção de uma absorvância próxima de  $\pm 0,72$  num comprimento de onda de 734 nm.

Prepararam-se soluções etanólicas dos compostos DC1, DC2, DC3, FER, CAF e TRX (5 mM; 2 mL). Diluíram-se 400  $\mu\text{L}$  destas soluções em 1600  $\mu\text{L}$  de etanol (1 mM, 2 mL) e, a partir destas, efetuaram-se várias diluições em eppendorfs de 1,5 mL de modo a obter concentrações crescentes de composto (tabela 3.4).

Tabela 3.4: registo dos volumes de solução de composto a 1 mM ( $V_{X\ 1\text{mM}}$ ) e de etanol ( $V_{\text{etanol}}$ ) para a preparação de soluções com concentração crescente ( $C_{\text{dil}}$ ).

$V_{X\ 1\text{mM}}/\mu\text{L}$	50	100	175	250	500
$V_{\text{etanol}}/\mu\text{L}$	950	900	825	750	500
$C_{\text{dil}}/\mu\text{M}$	50	100	175	250	500

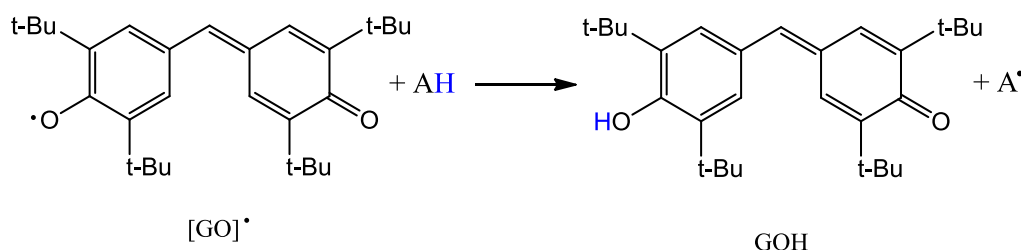
Em cada poço de uma microplaca pipetaram-se 20  $\mu\text{L}$  de cada solução etanólica do composto e 180  $\mu\text{L}$  da solução de radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  diluída. Portanto, cada solução foi diluída 10 vezes na microplaca, obtendo-se concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 17,5 $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . Preparou-se também um ensaio controlo (20  $\mu\text{L}$  de etanol e 180  $\mu\text{L}$  da solução de radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  diluída), correspondente a 100% de radical, e o branco (20  $\mu\text{L}$  de etanol e 180  $\mu\text{L}$  de água). Todas as aplicações na microplaca foram realizadas em triplicado.

Efetuaram-se leituras espectrofotométricas, num leitor de microplacas, num comprimento de onda de 734 nm durante 15 minutos, com intervalos de 1 minuto. A determinação do  $\text{IC}_{50}$  envolveu o uso da leitura registada aos 15 minutos. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  correspondem à média de 3 leituras  $\pm$  desvio padrão.

O procedimento foi adaptado da literatura [71].

### 3.7.1.3 Método do $\text{GO}^{\cdot}$

O radical 4-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno]metil]-2,6-bis(1,1- dimetiletil)fenoxilo ou galvinoxilo ( $\text{GO}^{\cdot}$ ) foi sintetizado por Galvin Coppinger em 1957.[93] O uso deste radical na avaliação da atividade antioxidante baseia-se na sua redução a  $\text{GOH}$  quando reage com doadores de hidrogénio, a qual pode ser monitorizada por espectrofotometria através da diminuição da absorvância aos 429 nm (fig. 3.9). [94, 95]

Fig. 3.9: reação de neutralização do radical  $\text{GO}^\bullet$  pelo antioxidante.

### 3.7.1.3.1 Procedimento experimental

Preparou-se uma solução etanólica do radical  $\text{GO}^\bullet$  (5 mM, 5,00 mL) que foi sujeita a sonicação a 40 °C durante 10 minutos para facilitar a dissolução. Diluíram-se 100  $\mu\text{L}$  desta solução em etanol num balão volumétrico de 5,00 mL (100  $\mu\text{M}$ ). Efetuou-se outra diluição da solução de radical  $\text{GO}^\bullet$  100  $\mu\text{M}$  até à obtenção de uma absorvância próxima de  $\pm 1,00$  num comprimento de onda de 428 nm.

Prepararam-se soluções etanólicas dos compostos DC1, DC2, DC3, FER, CAF e TRX (5 mM; 2 mL) e diluíram-se 400  $\mu\text{L}$  destas soluções em 1600  $\mu\text{L}$  de etanol (1 mM, 2 mL). Diluíram-se 500  $\mu\text{L}$  das soluções 1 mM em 1500  $\mu\text{L}$  de etanol (250  $\mu\text{M}$ , 2 mL) e, a partir destas, efetuaram-se várias diluições em eppendorfs de 1,5 mL de modo a obter concentrações crescentes de composto (tabela 3.5).

Tabela 3.5: registo dos volumes de solução de composto 250  $\mu\text{M}$  ( $V_{X\ 250\ \mu\text{M}}$ ) e de etanol  $V_{\text{etanol}}$  para a preparação de soluções com concentração crescente ( $c_{\text{dil}}$ ).

$V_{X\ 250\ \text{mM}}/\mu\text{L}$	20	40	100	200	300	400	600
$V_{\text{etanol}}/\mu\text{L}$	980	960	900	800	700	600	400
$c_{\text{dil}}/\mu\text{M}$	5	10	25	50	75	100	150

No caso do ácido ferúlico (FER), utilizaram-se duas concentrações adicionais: 250  $\mu\text{M}$  (usada nas diluições anteriores) e 350  $\mu\text{M}$  (diluição de 87,5  $\mu\text{L}$  de solução FER 1 mM em 112,5  $\mu\text{L}$  de etanol).

Em cada poço de uma microplaca pipetaram-se 20  $\mu\text{L}$  de cada solução etanólica do composto e 180  $\mu\text{L}$  da solução de radical  $\text{GO}^\bullet$  diluída. Portanto, cada solução foi diluída 10 vezes na microplaca, obtendo-se concentrações de 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  e, no caso do ácido ferúlico, 25  $\mu\text{M}$  e 35  $\mu\text{M}$ . Preparou-se também um ensaio controlo (20  $\mu\text{L}$  de etanol e 180  $\mu\text{L}$  da solução de radical  $\text{GO}^\bullet$  diluída), correspondente a 100% de radical, e o branco (200  $\mu\text{L}$  de etanol). Todas as aplicações na microplaca foram realizadas em triplicado.

Efetuarão-se leituras espectrofotométricas, num leitor de microplacas, num comprimento de onda de 428 nm durante 30 minutos, com intervalos de 1 minuto. A determinação do IC<sub>50</sub> envolveu o uso da leitura registada aos 30 minutos. Os valores de IC<sub>50</sub> correspondem à média de 3 leituras  $\pm$  desvio padrão.

O procedimento foi adaptado da literatura [96, 97, 98].

### 3.7.2 Quelatação do ferro (II): método da ferrozina

O método da ferrozina, proposto por *Stokey* em 1970, é usado na avaliação da quelatação do ferro (II). A ferrozina (ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazino-p,p'-dissulfónico) (fig. 3.10) é um reagente que forma um complexo magenta com ferro (II) [Fe(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> que apresenta um comprimento de onda de absorção máximo de 562 nm. [99], [100] O complexo forma-se completamente em solução aquosa no intervalo de pH 4-9. [101]

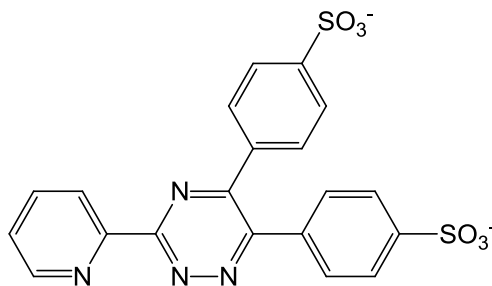


Fig. 3.10: estrutura química da ferrozina.

Neste ensaio realizaram-se duas leituras espectrofotométricas. A primeira leitura corresponde à incubação do antioxidante potencial com o ferro (II), podendo ocorrer a complexação do composto com o metal. Esta leitura permite retirar, caso exista, a absorvância resultante da interação do composto-teste com o ferro (II) no comprimento de onda utilizado. A segunda leitura diz respeito à adição de ferrozina à solução anterior que irá complexar com o ferro (II) livre.

Após a subtração entre as absorvâncias das duas leituras, a percentagem de ferro (II) quelatado (% quelatação Fe (II)) é obtida a partir da equação 3.2, sendo Abs<sub>controlo</sub> a absorvância correspondente ao máximo de formação do complexo [Fe(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> e Abs<sub>teste</sub> absorvância correspondente à formação do complexo [Fe(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> na presença do antioxidante potencial.

$$\% \text{ quelatação Fe (II)} = \frac{(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{teste}})}{Abs_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (3.2)$$

Tal como na atividade antioxidante, avaliou-se a quelatação do ferro (II) dos compostos sintetizados, dos ácidos ferúlico e cafeico e do trolox. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi utilizado como padrão.

### 3.7.2.1 Procedimento experimental

Preparou-se uma solução tampão de acetato de amónio pH 6,7 (0,2 M, 25 mL) (solução A) e uma solução de sulfato de ferro (II) amoniacal (2 mM, 2 mL) (solução B). Diluíram-se 250 µL de solução B em 24,75 mL da solução A, obtendo-se uma solução de sulfato de ferro (II) amoniacal a 20 µM.

Preparou-se também uma solução aquosa de ferrozina (5 mM, 2mL) e soluções dos compostos DC1, DC2, DC3, FER, CAF e TRX (5 mM; 2 mL), e de EDTA (5 mM; 1 mL) em dimetilsulfóxido.

As soluções foram preparadas em material de plástico (não contém ferro) para prevenir possíveis interferências.

Em cada poço de uma microplaca pipetaram-se 200 µL de solução de sulfato de ferro (II) amoniacal 20 µM e 4 µL da solução do composto a testar. No poço relativo ao branco pipetaram-se 200 µL de solução de sulfato de ferro (II) amoniacal 20 µM e 4 µL de dimetilsulfóxido. Todas as aplicações na microplaca foram realizadas em triplicado. Seguiu-se a incubação da microplaca a 37 °C durante 10 minutos e a leitura da absorvância a 562 nm.

Após a primeira leitura, adicionaram-se 4 µL de solução de ferrozina 5 mM. Incubou-se novamente a microplaca a 37 °C durante 10 minutos e efetuou-se a leitura da absorvância a 562 nm. Os resultados foram expressos em valores de % quelatação de ferro (II) correspondentes à média de 4 leituras  $\pm$  desvio padrão.

O procedimento foi adaptado da literatura [102].

## 3.8 Estudos eletroquímicos: avaliação do potencial redox

Os métodos eletroquímicos, como a voltametria e a polarografia, têm sido usados no estabelecimento de correlações entre a estrutura, potencial antioxidante e atividade biológica de espécies eletroativas. [103] Comparativamente a outras metodologias, apresentam uma série de vantagens, como a rapidez, simplicidade, custos reduzidos e baixo consumo de reagentes. [104]

As medições voltamétricas são geralmente efetuadas em células eletroquímicas, compostas por um elétrodo de trabalho, um elétrodo de referência e um elétrodo auxiliar (ou contra-elétrodo) (fig. 3.11). O elétrodo de trabalho é um condutor de eletrões onde

ocorre a reação de interesse. Em todas as medições voltamétricas, é necessário o uso de um eletrodo com um potencial constante, utilizando-se o eletrodo de referência para esse efeito. Por último, no eletrodo auxiliar ocorre uma reação contrária à do eletrodo de trabalho, mantendo assim o balanço de carga total no sistema. [105]

Na presença de uma espécie eletroativa, o potencial aplicado provoca uma alteração da sua concentração na superfície do eletrodo de trabalho através da sua oxidação ou redução. A variação da concentração de qualquer participante eletroativo é responsável pelo transporte de massa em direção à superfície do eletrodo, e a corrente que flui nos eletrodos é diretamente proporcional à concentração do analito. [105].

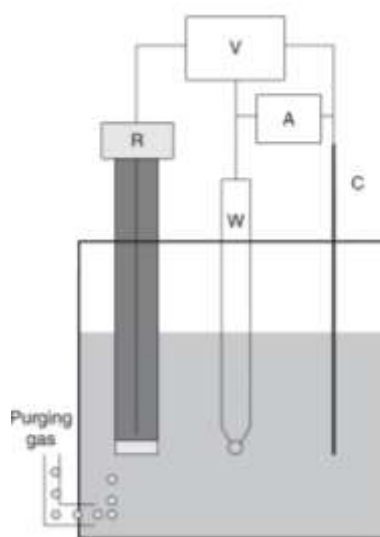


Fig. 3.11: representação de uma célula eletroquímica comum. R: eletrodo de referência, W: eletrodo de trabalho; C: eletrodo auxiliar (ou contra-eletrodo). Adaptado de [105].

A voltametria pode ser utilizada numa grande gama de aplicações, nomeadamente na avaliação da atividade antioxidante. Nesta área, é usada não só como método complementar na avaliação da atividade antioxidante, através da medição do potencial redox dos compostos, como também pode fornecer informações adicionais relativas à sua oxidação. [77]

Neste sentido, efetuou-se a avaliação do comportamento dos ácidos cinâmicos e dos seus derivados a pH fisiológico por voltametria de impulso diferencial e voltametria cíclica.

### 3.8.1 Voltametria de impulso diferencial

Na voltametria de impulso diferencial, o potencial é aplicado sob a forma de pequenos impulsos de amplitude constante (10-100 mV). Nesta técnica, a corrente é medida no início do impulso aplicado e no fim do mesmo impulso. Os resultados são

apresentados sob a forma de um voltamograma de impulso diferencial (fig. 3.12b) e resultam da diferença entre as correntes medidas para cada impulso. [105]

Os parâmetros mais importantes da voltametria de impulso diferencial são: a amplitude do impulso, correspondente à altura do impulso de potencial, a largura do impulso (duração do impulso de potencial) e período de amostragem (tempo no qual é medido o final do impulso de potencial) (fig. 3.12a). [105]

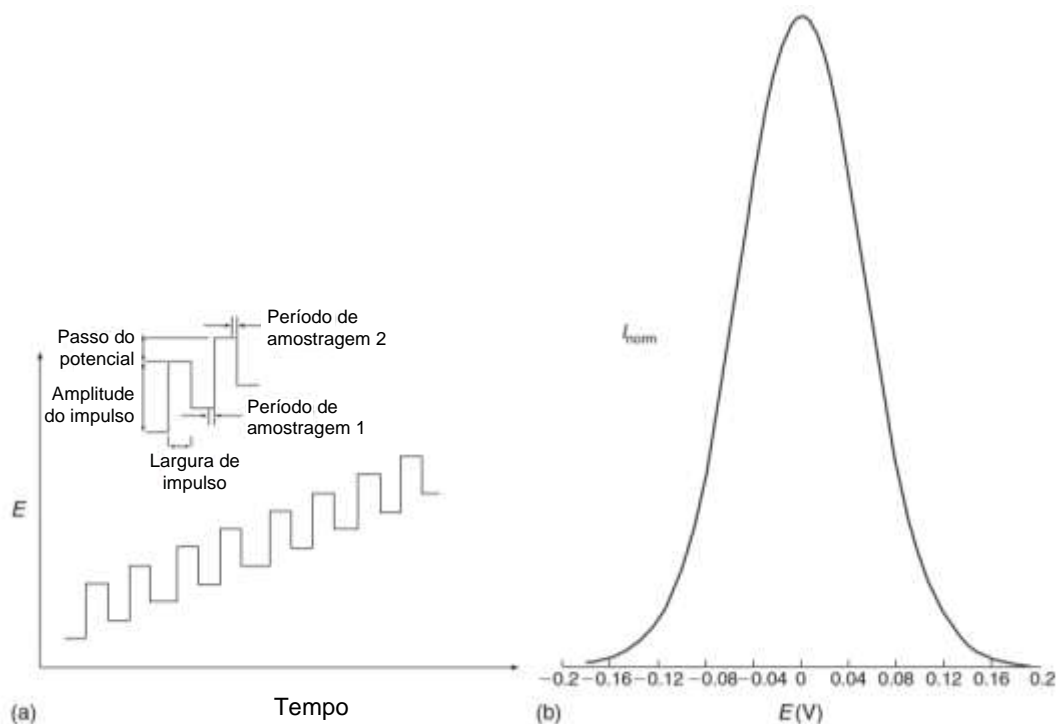


Fig. 3.12: (a) forma do potencial e (b) voltamograma resultante da voltametria de impulso diferencial. Adaptado de [105].

### 3.8.2 Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica, partindo de um potencial inicial  $E_i$ , é aplicado um varrimento de potencial em escada no eletrodo de trabalho (fig. 3.13a). Depois de se atingir o potencial  $E_f$ , o sentido do varrimento é invertido e o potencial retorna ao seu valor inicial. O parâmetro instrumental principal da voltametria cíclica é a velocidade de varrimento, na medida em que controla a escala de tempo das medições voltamétricas. [105]

Os resultados obtidos por esta metodologia apresentam a forma de um voltamograma cíclico (fig. 3.13b), no qual se encontram representadas graficamente curvas de corrente em função do potencial. [105] Durante o varrimento no sentido direto, o potencial do eletrodo de trabalho torna-se cada vez mais positivo e, portanto, o poder oxidante do eletrodo aumenta. À medida que o potencial do eletrodo se aproxima do potencial de oxidação da amostra ocorre a oxidação do composto, a qual é registada no voltamograma cíclico sob a forma de um pico anódico ( $E_{p,a}$ ). Quando o potencial atinge o

valor final ( $E_f$ ), a direção do varrimento é revertida e o potencial é registado na direção catódica. Durante este varrimento, o potencial do eletrodo de trabalho torna-se mais negativo e, portanto, o poder redutor do eletrodo aumenta. A presença ou ausência do pico catódico ( $E_{p,c}$ ) no varrimento reverso dá informações acerca da reversibilidade da reação redox do composto oxidado durante o varrimento no sentido anódico. [106]

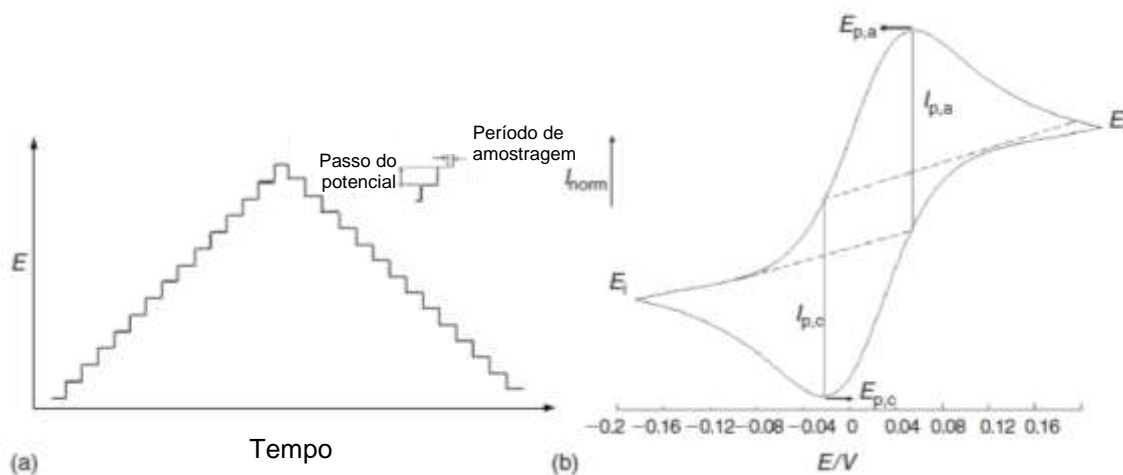


Fig. 3.13: (a) potencial em escada usado em voltametria cíclica. (b) voltamograma cíclico simulado para uma transferência reversível de um eletrão.  $E_{p,c}$ : pico do potencial catódico;  $E_{p,a}$ : pico do potencial anódico;  $E_i$ : potencial inicial;  $E_f$ : potencial de troca;  $I_{p,c}$ : corrente do poço catódico;  $I_{p,a}$ : corrente do pico anódico. Adaptado de [105].

### 3.8.3 Procedimento experimental

Prepararam-se soluções-mãe dos compostos DC1, DC2, DC3, FER, CAF e DMC com uma concentração de 10 mM através da dissolução da massa adequada em 10 mL de etanol. Na célula eletroquímica diluíram-se 100  $\mu$ L de cada uma das soluções anteriores em 10,00 mL de eletrólito de suporte (tampão fosfato pH 7,4) de modo a obter uma concentração final de 100  $\mu$ M. As leituras foram efetuadas a temperatura ambiente.

O eletrólito de suporte foi preparado através da mistura de soluções de hidrogenofosfato de potássio (0,2 M; 6,2 mL) e de di-hidrogenofosfato de potássio (0,2 M, 43,8 mL) em água desionizada.

Na voltametria de impulso diferencial utilizaram-se as seguintes condições experimentais: largura de impulso de 70 ms, amplitude de impulso de 50 mV e velocidade de varrimento de 5 mV/s.

Na voltametria cíclica utilizou-se um degrau de potencial de 2 mV e uma velocidade de varrimento de 20 mV/s.

Antes de cada ensaio efetuou-se a leitura do branco através do varrimento de potencial do eletrólito de suporte. Entre cada análise, a superfície do eletrodo foi limpa para remover possíveis compostos adsorvidos que poderiam influenciar as leituras seguintes.



O procedimento foi adaptado da literatura [78].

### 3.9 Avaliação teórica das propriedades físico-químicas

O desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças no sistema nervoso central (SNC) é uma área desafiante da indústria farmacêutica dada a complexidade da biologia do cérebro e das suas patologias. [107] O cérebro é provavelmente um dos órgãos mais inacessíveis no que diz respeito à entrada de entidades químicas devido à existência de barreiras fisiológicas que separam o SNC do sangue e que modelam a entrada e saída de substâncias endógenas e exógenas [108], destacando-se a barreira hematoencefálica (BHE).

A BHE é obstáculo principal para o sucesso das terapias destinadas ao sistema nervoso central. [109] Para além das células endoteliais dos capilares do cérebro, esta barreira é formada por uma membrana basal extracelular, astrócitos, perícitos e células da microglia. Juntamente com os neurónios vizinhos, estes componentes formam uma unidade neovascular (fig. 3.14). [110]

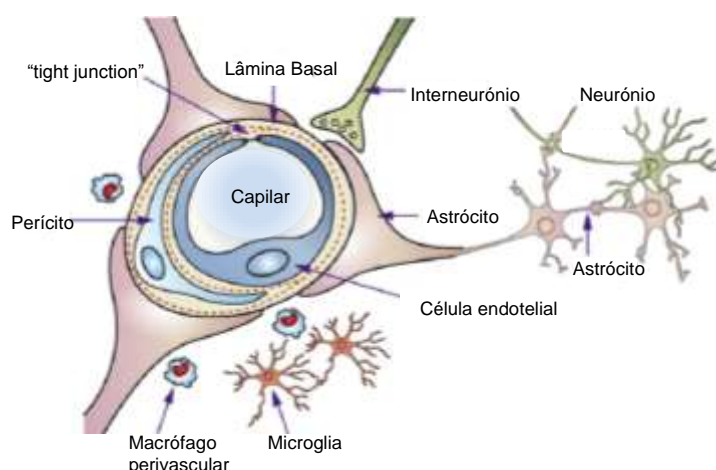


Fig. 3.14: Representação da barreira hematoencefálica e de outros componentes da unidade neurovascular. Adaptado de [110].

As células endoteliais presentes na BHE diferem das existentes no resto do organismo devido à presença de "*tight junctions*", ausência de fenestrações e reduzido transporte vesicular pinocítico. Além disso, também contêm transportadores de influxo e efluxo de fármacos, são metabolicamente competentes e possuem permeabilidade paracelular baixa, restringindo assim a passagem de fármacos. [108, 111]

A passagem de compostos ao longo da BHE pode ocorrer através de diversos mecanismos que englobam a difusão, transcitose ou o uso de proteínas transportadoras (fig. 3.15). [110]

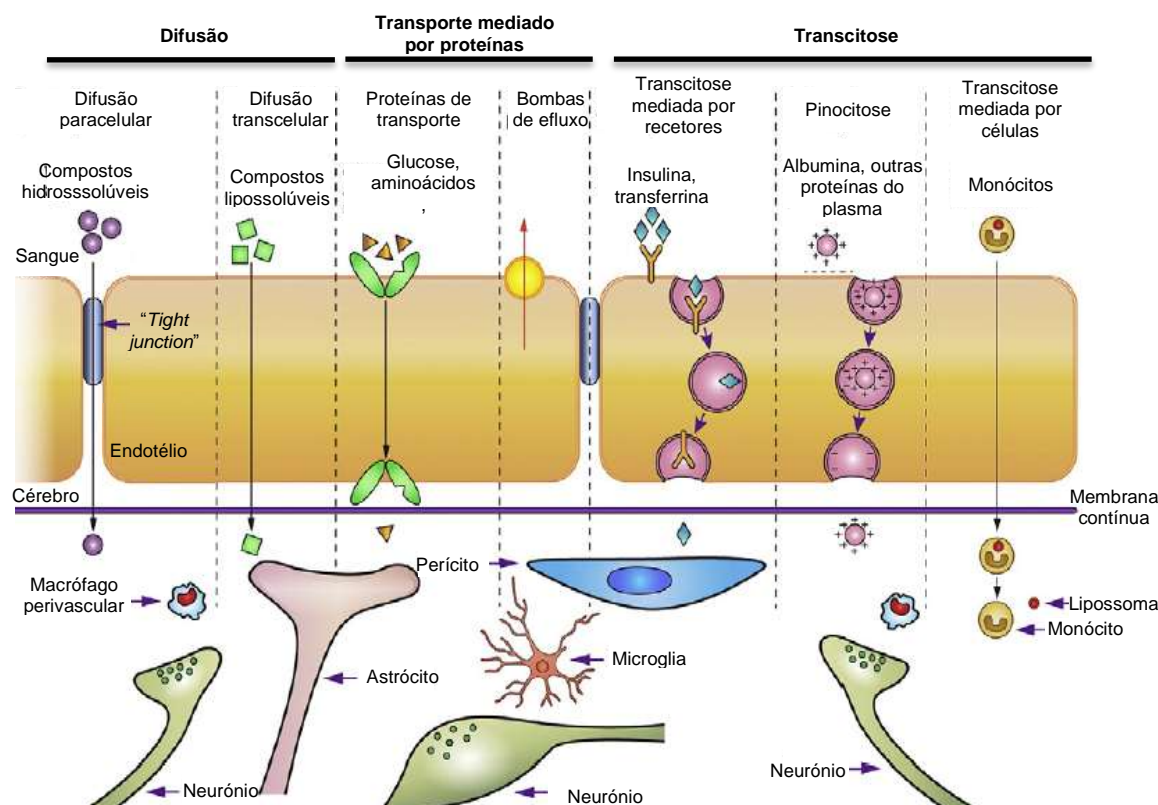


Fig. 3.15: Vias de transporte ao longo da barreira hematoencefálica . Adaptado de [110].

O transporte transcelular por difusão passiva é influenciado pelas propriedades físico-químicas das moléculas, nomeadamente a lipofilia, o peso molecular, o número de dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio [112] e o número de ligações com rotação. [113]

A lipofilia é geralmente expressa sob a forma do logP e descreve a distribuição dos compostos entre uma fase orgânica imiscível em água e um meio aquoso. Esta propriedade influencia não só a solubilidade e a passagem ao longo das membranas biológicas, [114] como também a ligação a proteínas do plasma e suscetibilidade para o metabolismo oxidativo. [115]

Um peso molecular elevado está associado a uma passagem menor ao longo do trato gastrointestinal ou da barreira hematoencefálica. Um número excessivo de grupos dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio também interfere na passagem ao longo das membranas biológicas.[112]

O número de ligações com rotação reflete a flexibilidade conformacional da molécula, o que por sua vez influencia a sua biodisponibilidade. Uma maior flexibilidade conformacional está associada a uma energia mais elevada necessária para a adoção de um estado conformacional específico, influenciando a passagem por membranas celulares ou a ligação a alvos farmacológicos. [115]

Numa tentativa de relacionar as propriedades dos compostos com a sua passagem ao longo da BHE, efetuou-se uma determinação teórica dos parâmetros referidos para os compostos sintetizados e para os respetivos ácidos hidroxicinâmicos.

### 3.9.1 Procedimento experimental

O peso molecular, o logP, os números de dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio e o número de ligações com rotação foram calculados através do software Molinspiration Cheminformatics® (disponível em [www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)).

## 3.10 Avaliação da citotoxicidade e neuroproteção em modelo celular

Os ensaios em células são usados nas fases iniciais da descoberta de fármacos. Dentro de uma série de aplicações, o seu uso fornece informações relativas à atividade biológica e perfil toxicológico de candidatos a fármacos. [116] Na indústria farmacêutica, a maioria destes ensaios é realizada em linhas celulares imortalizadas, [117] podendo representar uma resposta específica de um dado tecido. [118]

Neste contexto, utilizou-se uma linha celular humana de neuroblastoma (SH-SY5Y) para avaliar a citotoxicidade e as propriedades neuroprotetoras dos compostos sintetizados. Os passos executados estão esquematizados na fig. 3.16.

A SH-SY5Y é uma linha celular derivada da subclonagem da linha celular SK-N-SH. [119] Estas células permanecem num estado inicial de diferenciação neuronal, caracterizada em termos bioquímicos pela presença reduzida de marcadores neuronais. [120] Possui um fenótipo catecolaminérgico, incluindo a capacidade de transportar dopamina e noradrenalina, expressar enzimas para a síntese e metabolismo da dopamina e acetilcolina e expressar recetores de dopamina e acetilcolina. [121] A linha celular SH-SY5Y tem sido usada em estudos neurológicos experimentais, como a análise da neurotoxicidade, da neuroproteção e da diferenciação, metabolismo e função neuronais relacionados com processos neurodegenerativos e neuroadaptativos. [122] Esta linha é caracterizada por ser sensível ao stress oxidativo, a qual pode resultar do conteúdo baixo em certos antioxidantes ou do aumento da formação de radicais associada à síntese da dopamina. [123]

Durante o crescimento da cultura, as células produzem moléculas de adesão responsáveis pela sua agregação ao suporte em que se encontram. Quando a cultura atinge um estado próximo da confluência (isto é, quando a superfície está totalmente coberta de células), o tratamento com tripsina permite a desadesão celular através da sua ação proteolítica sobre as moléculas de adesão. Após a contagem no número de

células viáveis, a suspensão de células é usada na passagem de um número de células específico para placas com 24 poços e para um frasco de cultura novo.

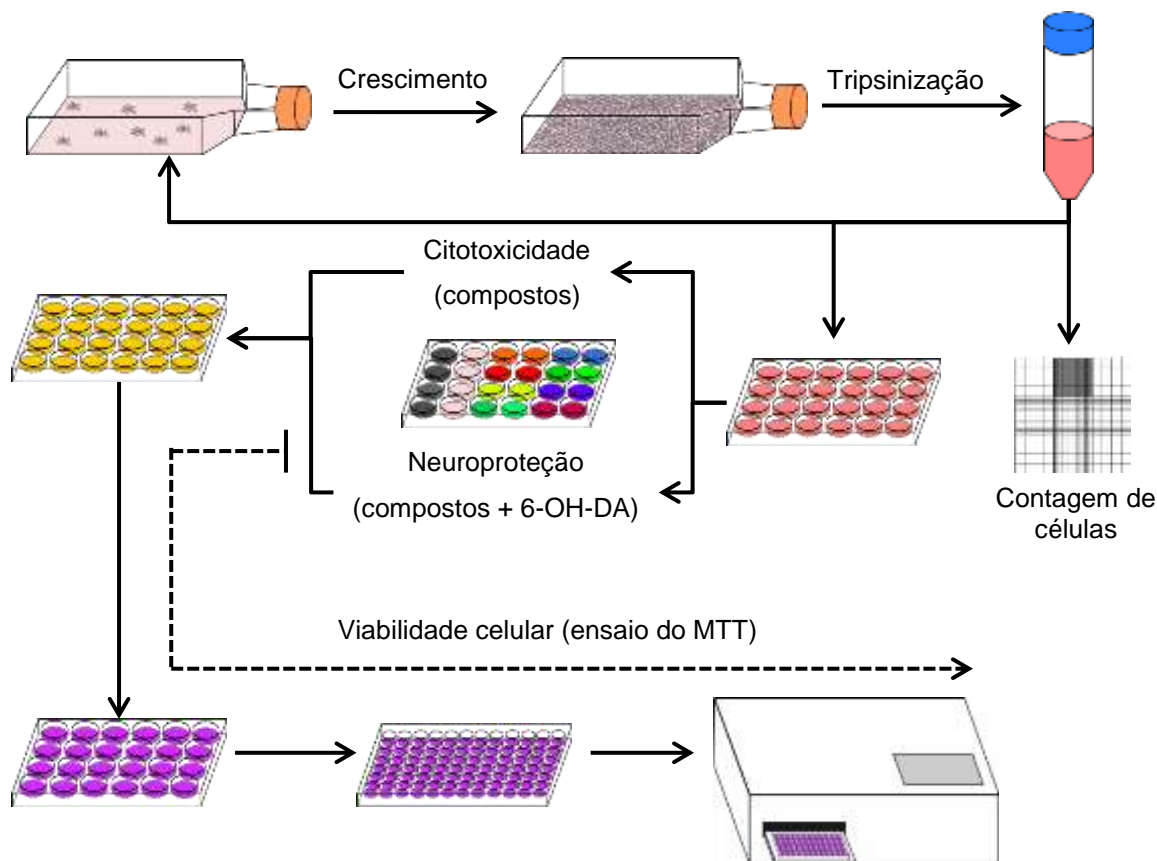


Fig. 3.16: Sequência de passos realizados na avaliação da citotoxicidade e neuroproteção dos compostos em células de neuroblastoma.

A determinação do número de células viáveis envolveu a mistura de uma alíquota da suspensão com um corante vital – azul tripano – seguida de contagem numa câmara de Neubauer (fig. 3.17) com recurso a um microscópio. O azul tripano é um corante usado para avaliar a viabilidade celular, uma vez que as células vivas conseguem excluí-lo enquanto as células mortas incorporam o corante. Considerando o volume da área sombreada na fig. 3.17 e a diluição da suspensão celular no corante, a concentração celular (nº de células/mL) pode ser determinada a partir da equação 3.3.

$$\text{Concentração celular} = \frac{\text{nº de células}}{\text{nº de campos contados}} \times 2 \times (10^{-4})^{-1} \text{ cm}^{-3} \quad (3.3)$$

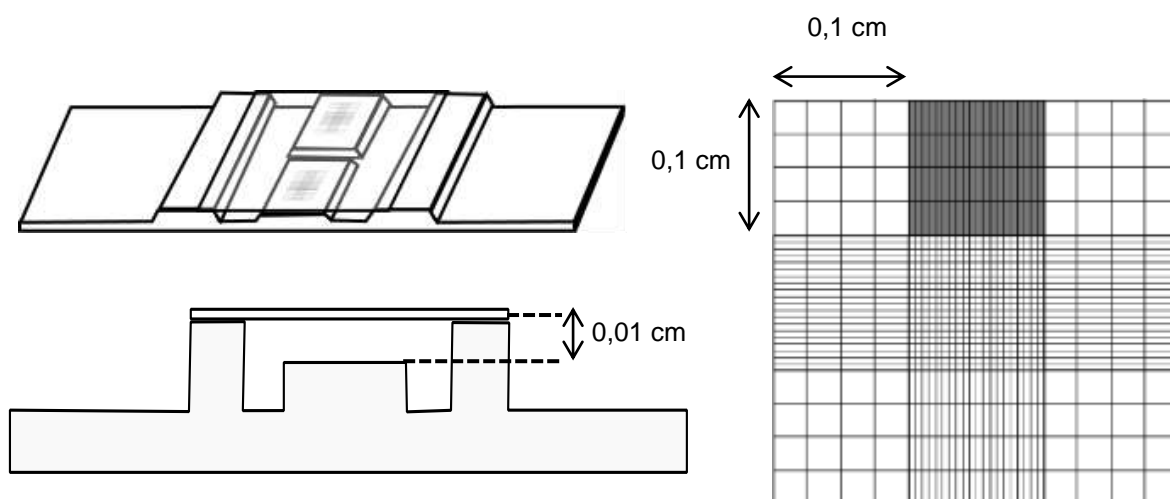


Fig. 3.17: câmara de Neubauer e dimensões associadas.

A incubação das células com os compostos permitiu a avaliação da citotoxicidade. Na neuroproteção, as células foram também incubadas com um indutor do stress oxidativo – 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) –. Dada a semelhança estrutural com a dopamina, a 6-OH-DA tem uma afinidade elevada para o transportador de dopamina, o qual transporta a toxina para o interior dos neurónios. Uma vez dentro da célula, a 6-OH-DA acumula-se no citosol e sofre auto-oxidação, promovendo a formação de radicais livres (principalmente o peróxido de hidrogénio). [124, 125] Além disso, pode acumular-se na mitocôndria onde inibe a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória, resultando na depleção do ATP. [125]

A percentagem de células vivas na avaliação da citotoxicidade e da neuroproteção foi determinada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetoxitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método foi descrito por Mossman em 1983 e baseia-se na redução do MTT por desidrogenases de células ativas através da quebra do anel de tetrazólio (fig. 3.18). [126] O formazano resultante é insolúvel em meio aquoso e, como não consegue atravessar membranas, acumula-se no interior das células vivas sob a forma de cristais. [127] Os cristais de formazano podem ser quantificados espectralmente num comprimento de onda entre os 450 e os 600 nm após a sua solubilização em solventes orgânicos (ex: DMSO, isopropanol). [128, 129] A absorvância é proporcional à quantidade de formazano dissolvido e, portanto, ao número de células viáveis. [129]

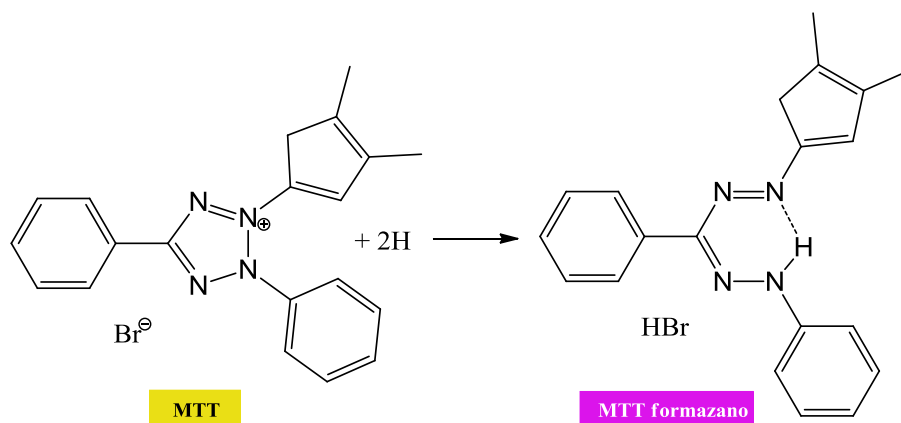


Fig. 3.18: Redução do MTT no respetivo formazano. Adaptado de [130]

### 3.10.1 Procedimento experimental

#### Crescimento e tripsinização

As células cresceram em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, em meio de cultura completo. Quando a cultura atingiu a confluência, realizou-se a tripsinização da cultura. A remoção do meio de cultura e lavagem da cultura de células com 8 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) foram seguidas pela adição de 3 mL de tripsina (tripsina (0,25%, (m/V)), glucose anidra (0,1% (m/V)) e EDTA (0,05% (m/V))) e incubação a 37°C durante 1 minuto. Adicionaram-se de 9 mL de meio completo para parar a ação da tripsina. Após a ressuspensão da cultura de células efetuou-se a centrifugação a 1300 rpm durante 3 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 6 mL de meio de cultura completo.

Para o plaqueamento em placas com 24 poços, parte da suspensão de células foi diluída em meio de cultura completo de modo a obter 10<sup>5</sup> células em cada poço num volume de 300 µL. As células foram incubadas na estufa durante 24h.

Para a obtenção de uma nova passagem de células, transferiu-se uma diluição de 500 µL da suspensão celular em 8mL de meio de cultura completo para um frasco de cultura de 75cm<sup>2</sup>.

#### Avaliação da citotoxicidade e da neuroproteção

Prepararam-se soluções dos compostos DC1, DC2 e DC3 com concentração igual a 100 mM, dissolvendo a massa apropriada em DMSO. A partir desta, efetuaram-se diluições em DMSO de modo a obter soluções de 1 e 10 mM, sendo depois diluídas 30µL destas soluções em 70 µL de meio de cultura sem FBS (concentrações = 0,3 mM e 3

mM, respetivamente; % DMSO = 30%). Na avaliação da neuroproteção, preparou-se ainda uma solução de 30 mM de 6-OH-DA em água destilada.

Antes da incubação das células com os compostos, removeu-se o meio de culturas de cada um dos poços da placa.

No ensaio da citotoxicidade, adicionou-se 1  $\mu$ L da solução dos compostos-teste (concentrações finais = 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M; % DMSO = 0,1%) e 299  $\mu$ L de meio sem FBS. No poço correspondente ao controlo, adicionaram-se 300  $\mu$ L de meio de cultura sem FBS.

Para a avaliação da neuroproteção, realizou-se uma pré-incubação das células com 1  $\mu$ L da solução dos compostos-teste e 298  $\mu$ L de meio sem FBS durante 1 h, seguindo-se a adição de 1  $\mu$ L da solução de 6-OH-DA. No poço correspondente ao controlo, adicionaram-se 299  $\mu$ L de meio de cultura sem FBS e 1  $\mu$ L de uma mistura de DMSO diluída em meio de cultura sem FBS numa proporção de 3:7. Para avaliar a morte celular induzida pelo 6-OH-DA, preparou-se ainda um poço contendo 298  $\mu$ L de meio de cultura sem FBS, 1  $\mu$ L de uma mistura de DMSO diluída em meio de cultura sem FBS numa proporção de 3:7, e 1  $\mu$ L da solução de 6-OH-DA.

As células foram incubadas na estufa durante 24h.

#### Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

Após o período de incubação, retirou-se o meio de cultura de cada um dos poços e pipetaram-se 200  $\mu$ L de uma solução de MTT 0,5 mg/mL em PBS. As células foram incubadas na estufa durante 2h30min. Retirou-se a solução de MTT dos poços e dissolveram-se os cristais formados em 200  $\mu$ L de DMSO. Transferiram-se, em triplicado, 50  $\mu$ L para uma placa com 96 poços e efetuou-se a leitura da absorvância num leitor de microplacas (filtro medidor: 540 nm; filtro de referência: 690 nm). A percentagem de viabilidade celular na presença de cada composto foi calculada relativamente ao controlo. Os resultados foram expressos sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

## 4. Resultados e discussão



## 4.1 Síntese de antioxidantes

### 4.1.1 Otimização dos procedimentos de proteção e desproteção de fenóis

Antes da síntese dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, foram avaliadas diferentes condições para a proteção e desproteção (fig. 4.1) do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído. As condições escolhidas foram depois aplicadas no 3,4-dihidroxibenzaldeído.

Os resultados obtidos na introdução do grupo MEM encontram-se sumariados na tabela 4.1. Enquanto a presença de TBAI influenciou positivamente o rendimento da reação, o aumento da quantidade de reagente protetor e do tempo de reação não gerou nenhuma alteração significativa. Assim, nas proteções seguintes de grupos hidroxilo utilizou-se o TBAI e as condições que envolveram o menor tempo de reação e menor quantidade de MEMCl.

Na remoção do grupo MEM (tabela 4.2), a desproteção do fenol só ocorreu quando se aumentou em 100 vezes a quantidade de resina comparativamente ao procedimento original. O aumento da temperatura não influenciou significativamente o rendimento da reação.

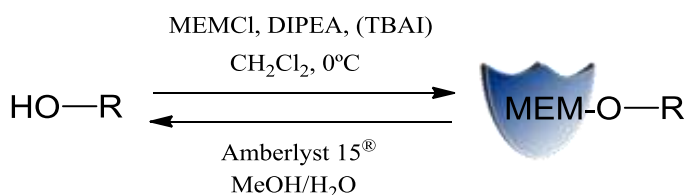


Fig. 4.1: reações de proteção e desproteção de grupos hidroxilo.

Tabela 4.1: registo das condições avaliadas na proteção de fenóis com o MEMCl e os respetivos rendimentos. Abreviaturas: R-OH: fenol; TBAI: iodeto de tetrabutilamónio; MEMCl: cloreto de 2-metoxietoximetilo;

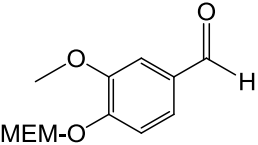
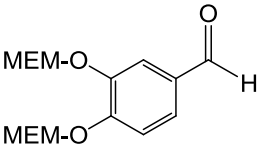
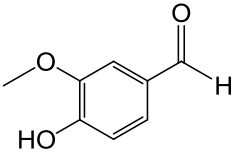
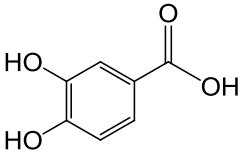
Produto da reação	n <sub>R-OH</sub> /mmol	n <sub>TBAI</sub> /mmol	n <sub>MEMCl</sub> /mmol	t/h	η/%
	1	0	1,5	3	49,0
	1	0,05	1,5	3	78,3
	1	0,05	1,5	24	78,0
	1	0,05	2	3	78,8
	1	0,10	3,0	3	67,6

Tabela 4.2: registo das condições avaliadas na desproteção de fenóis e os respetivos rendimentos. Abreviaturas: MEM-R – produto protegido.

Produto da reação	n <sub>MEM-R</sub> /mmol	m <sub>resina</sub> /g	t/h	T/°C	η/%
	1	0,01	1	40	_____
	1	0,1	3	40	_____
	1	1	7	40	<b>55,9</b>
	1	1	7	50	60,1
	1	1	6	40	68,0

De um modo geral, os rendimentos obtidos foram moderados a bons (55,9% a 78,3%). As condições destacadas nas tabelas foram usadas na síntese de derivados do ácido hidroxicinâmico.

#### 4.1.2 Síntese de antioxidantes baseados na estrutura do ácido hidroxicinâmico

A síntese dos compostos DC1 e DC2 envolveu uma sequência de três passos: proteção dos grupos hidroxilo (i), reação de elongação (ii) e remoção do grupo protetor (iii). Na síntese do composto DC3 não foi necessário realizar os passos (i) e (iii). As reações efetuadas e os respetivos rendimentos encontram-se esquematizados na fig. 4.2.

Tal como se referiu anteriormente, o rendimento da alquilação dos grupos hidroxilo com o MEMCl foi elevado. O uso de uma massa superior de composto de partida na síntese dos compostos comparativamente à otimização explica a diferença de rendimentos obtidos na mesma reação, uma vez que a perda da mesma quantidade de composto final durante a purificação reflete-se mais no rendimento quando se utilizam massas mais baixas.

A reação de introdução do espaçador não foi completa. Apesar de prevenir a formação de produtos secundários derivados de reações com o grupo hidroxilo, o grupo MEM parece diminuir a reatividade do grupo aldeído. A retenção dos compostos na sílica durante a cromatografia em coluna também limitou o rendimento do processo sintético.

Por outro lado, os rendimentos da remoção do grupo protetor dos compostos 2 e 5 foram mais baixos do que a desproteção dos respetivos aldeídos. O aumento da deslocalização eletrónica resultante da reação de elongação influencia negativamente a

protonação dos oxigénios e a subsequente saída do grupo MEM. Como este efeito foi mais acentuado no composto 5, realizaram-se alterações da resina e/ou das proporções de metanol e água, mas os rendimentos apresentaram a mesma ordem de grandeza.

Apesar das limitações que surgiram no segundo e terceiro passos, obtiveram-se quantidades suficientes para a caracterização estrutural e para os ensaios *in vitro*.

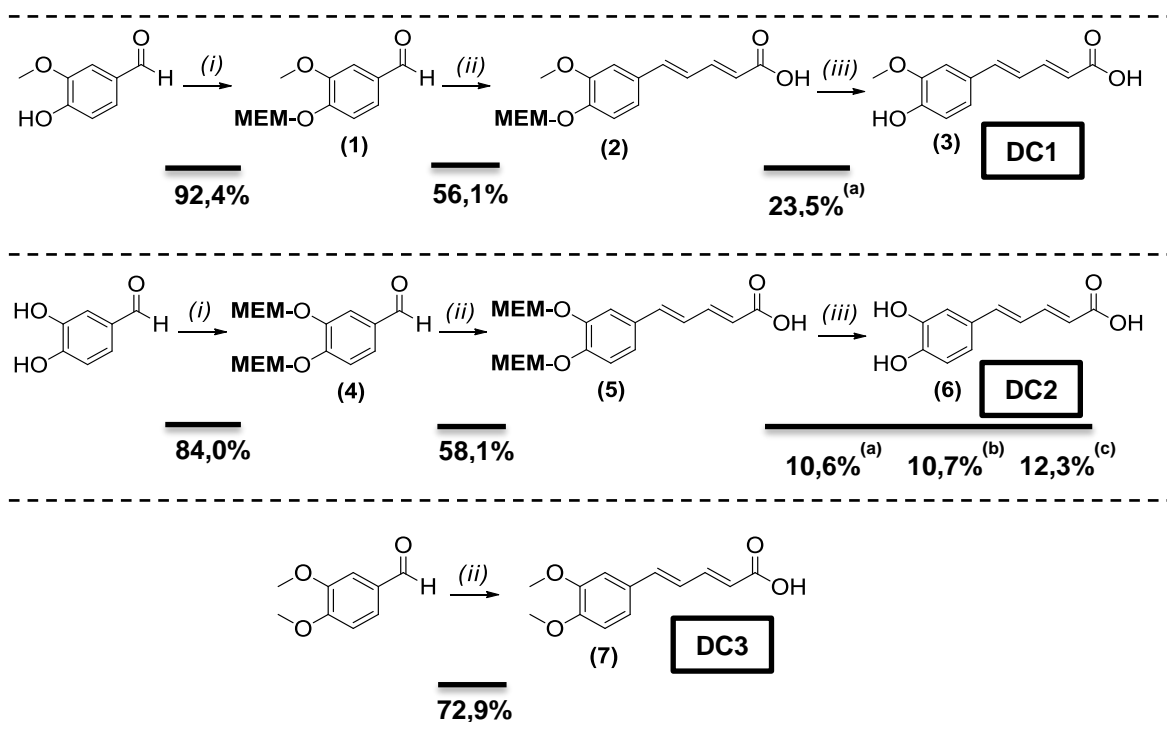


Fig. 4.2: rendimentos obtidos em cada um dos passos de síntese dos derivados do ácido hidroxicinâmico.

O composto DC1 também foi recentemente sintetizado por Li *et al.* [131] Após a preparação do reagente de elongação ( $\eta=35\%$ ), a síntese foi efetuada em três passos que envolvem uma acetilação ( $\eta=82\%$ ) seguida de elongação da cadeia conjugada ( $\eta=30\%$ ) e uma hidrólise ( $\eta=91\%$ ). Apesar das dificuldades que surgiram, a alquilação com MEMCl, seguida de reação com o crotonato de etilo e remoção do grupo MEM é vantajosa relativamente à sequência descrita pelos autores do artigo. A síntese envolveu um menor número de passos e condições reacionais mais suaves, requerendo um menor número de reagentes e de purificações. Assim, este é um processo com menores custos e mais sustentável em termos ambientais.

4.2 Elucidação estrutural dos compostos sintetizados

As estruturas dos compostos sintetizados e dos respectivos intermediários foram elucidadas por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT. Numa tentativa de associar os prótons e carbonos do espaçador introduzido aos respectivos sinais, realizou-se ainda a análise por RMN bidimensional – COSY e HSQC – do composto DC1.

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Protão e COSY

Nas tabelas 4.3 a 4.7 encontram-se descritos os dados de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos sintetizados, nomeadamente os desvios químicos (δ), integração, multiplicidade e constantes de acoplamento (J) de cada um dos sinais.

Os prótons dos grupos CHO, OCH<sub>3</sub> e OH apresentam-se sob a forma de um singlete com desvios químicos na ordem de 9,7-9,9 ppm, 3,9-4,0 ppm e 9,4 ppm, respetivamente.

O protão H(6) apresenta a multiplicidade de um duplo duplete (J<sub>1</sub>=1,9 Hz, J<sub>2</sub>=8,5 Hz) resultante do acoplamento com um protão na posição meta (H(2)) e outro na posição orto (H(5)). Os prótons H(2) e H(5) surgem sob a forma de duplete, com constantes de acoplamento iguais a 1,9 Hz e 8,5 Hz, respetivamente. A multiplicidade destes dois sinais resulta do acoplamento com H(6) (fig. 4.3a).

Nos compostos protegidos com o grupo MEM surge um singlete representativo de CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> num desvio químico mais baixo, seguindo-se dois multipletos correspondentes aos prótons do grupo OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O e, por último, um singlete característico de OCH<sub>2</sub>O (fig. 4.3b).

Tabela 4.3: resultados de RMN de <sup>1</sup>H do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e do 3,4-di-hidroxibenzaldeído.

			δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz		δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz
Anel aromático	H(2)		7,42	2	m	—		7,23	1	d	1,9
	H(5)		7,04	1	d	8,5		6,89	1	d	8,0
	H(6)		7,42	2	m	—		7,26	1	dd	2,0, 8,1
	CHO		9,83	1	s	—		9,70	1	s	—
	OCH <sub>3</sub>		3,98	3	s	—		—	—	—	—
	OH		—	—	—	—		—	—	—	—

Tabela 4.4: resultados de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos 1 e 4.

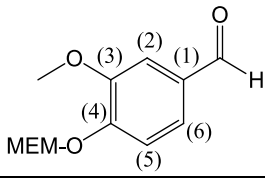
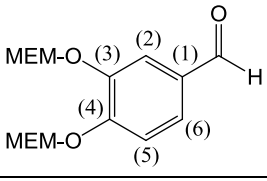
									
		δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz	δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz
Anel aromático	H(2)	7,43	2	m	—	7,71	1	d	1,9
	H(5)	7,32	1	d	8,7	7,33	1	d	8,4
	H(6)	7,43	2	m	—	7,52	1	dd	1,9, 8,4
	CHO	9,87	1	s	—	9,88	1	s	—
	OCH <sub>3</sub>	3,94	3	s	—	—	—	—	—
Grupo MEM	OCH <sub>2</sub> O	5,42	2	s	—	5,37	2	s	—
	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	3,88	2	m	—	5,41	2	s	—
	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	3,56	2	m	—	3,87	4	m	—
	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	3,36	3	s	—	3,56	4	m	—
						3,37	3	s	—
						3,38	3	s	—

Tabela 4.5: resultados de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos 2 e 5.

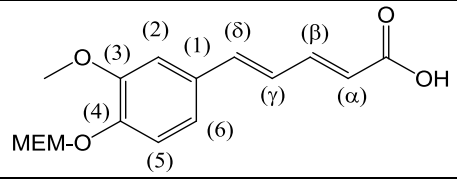
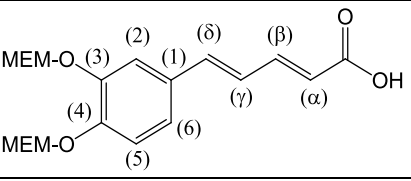
									
		δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz	δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz
Anel aromático	H(2)	7,06	2	m	—	7,31	1	d	1,2
	H(5)	7,19	1	d	8,9	7,19	2	m	—
	H(6)	7,06	2	m	—	7,19	2	m	—
	OCH <sub>3</sub>	3,92	3	s	—	—	—	—	—
Grupo MEM	OCH <sub>2</sub> O	5,34	2	s	—	5,32	2	s	—
	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3,87	2	m	—	5,33	2	s	—
	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3,56	2	m	—	3,87	4	m	—
	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	3,37	3	s	—	3,57	4	m	—
Espaçador	Hα	6,84	2	m	—	3,39	3	s	—
	Hβ	7,97	1	ddd	1,0, 11,3, 14,6	3,41	3	s	—
	Hγ	6,84	2	m	—	6,74	2	m	—
	Hδ	5,71	3	d	11,0	5,72	3	d	11,3
	COOH	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabela 4.6: resultados de RMN de <sup>1</sup>H dos compostos DC1 e DC2.

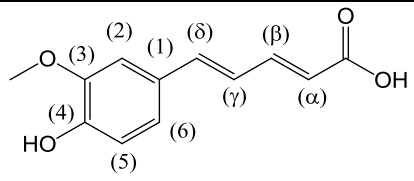
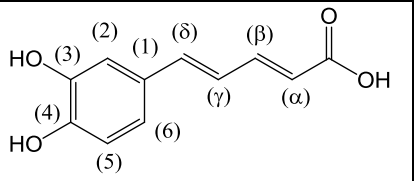
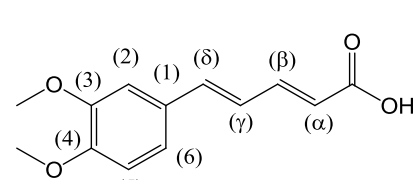
									
		δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz	δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz
Anel aromático	H(2)	7,04	1	d	1,7	6,98	1	d	1,9
	H(5)	6,82	1	d	8,1	6,77	4	m	—
	H(6)	6,99	1	dd	1,7, 8,1	6,77	4	m	—
	OCH <sub>3</sub>	3,80	3	s	—	—	—	—	—
	OH	9,43	1	s	—	9,37	2	s	—
Espaçador	Hα	6,87	1	d	15,7	6,77	4	m	—
	Hβ	7,83	1	dd	11,7, 15,7	7,79	1	ddd	0,8, 11,5, 15,7
	Hγ	6,78	1	t	11,5	6,77	4	m	—
	Hδ	5,60	1	d	11,2	5,58	1	d	11,1
	COOH	12,16	1	s	—	12,17	1	s	—

Tabela 4.7: resultados de RMN de <sup>1</sup>H dos composto DC3.

					
		δ/ppm	Integr.	Mult.	J/Hz
Anel aromático	H(2)	7,09	2	m	—
	H(5)	6,98	1	d	8,2
	H(6)	7,09	2	m	—
	OCH <sub>3</sub>	3,79	3	s	—
	OCH <sub>3</sub>	3,80	3	s	—
Espaçador	Hα	6,91	1	d	15,7
	Hβ	7,88	1	dd	11,5, 15,7
	Hγ	6,80	1	t	11,3
	Hδ	5,65	1	d	11,2
	COOH	12,22	1	s	—

A análise do acoplamento dos prótons do composto DC1 por COSY possibilitou a atribuição dos sinais ao respetivo próton do espaçador e extrapolar esses resultados para as restantes moléculas (fig. 4.4). De um modo geral, observa-se um sinal com a multiplicidade de um duplo duplete ou duplo duplo duplete ( $J_1=0,8-1,4$  Hz;  $J_2=11,5-11,7$  Hz,  $J_3=15,5-15,7$  Hz) cujo desvio químico varia entre 7,8 e 8,0 ppm e que corresponde a  $H\beta$ . O desdobramento referido resulta do acoplamento com dois prótons com configuração *trans* ( $H\alpha$  e  $H\gamma$ ) e com um próton do grupo ácido carboxílico. Entre os 6,7 e os 6,9 ppm surge um duplete ( $J=15,4-15,7$  Hz) resultante do acoplamento com um próton com configuração *trans* ( $H\beta$ ) e que caracteriza o próton  $H\alpha$ . Num desvio químico ligeiramente inferior ao  $H\alpha$  aparece um sinal com a multiplicidade de um tripleto ( $J=11,3-11,5$  Hz) característico de  $H\gamma$ , o qual acopla com dois prótons com configuração *trans*. Por último, o sinal referente a  $H\delta$  é um duplete ( $J=11,3-11,5$  Hz) com um desvio químico que varia entre 5,6 e 5,7 ppm (fig. 4.3c).

Portanto, os sinais dos prótons do espaçador surgem na seguinte ordem:  $H\delta < H\gamma < H\alpha < H\beta$ . De facto, o  $H\beta$  encontra-se mais desprotegido devido ao efeito mesomérico negativo derivado da presença do grupo carbonilo.  $H\alpha$  encontra-se mais desprotegido do que  $H\gamma$ , como consequência do efeito indutivo negativo também exercido pelo grupo carbonilo (fig. 4.5).

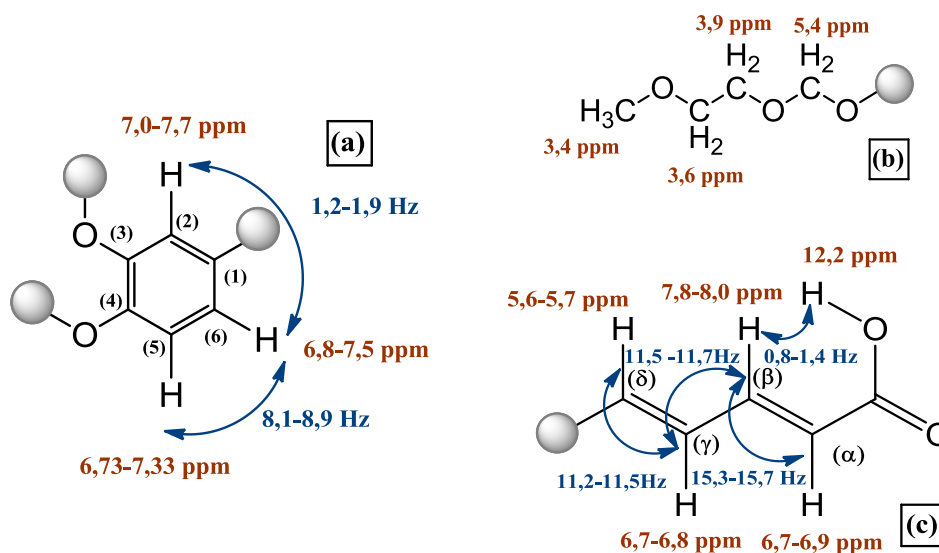


Fig. 4.3: representação geral dos desvios químicos e constantes de acoplamento dos prótons (a) do anel aromático, (b) do grupo MEM e (c) do espaçador (azul: constantes de acoplamento médias; castanho: desvios químicos médios).

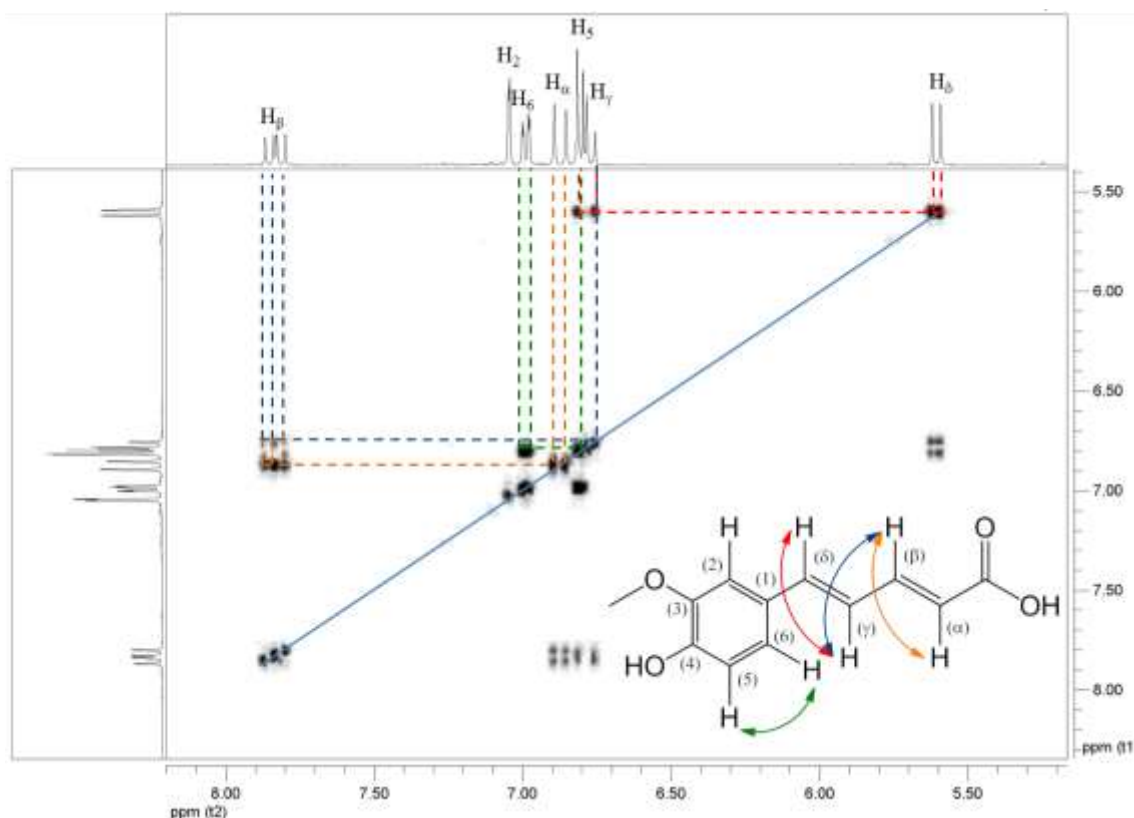


Fig. 4.4: COSY do composto DC1. Na figura é possível observar o acoplamento de  $H_\beta$  com  $H_\alpha$  (laranja) e  $H_\gamma$  (azul). Verifica-se ainda o acoplamento de  $H_\gamma$  com  $H_\delta$  (vermelho) e de  $H(5)$  com  $H(6)$  (verde).

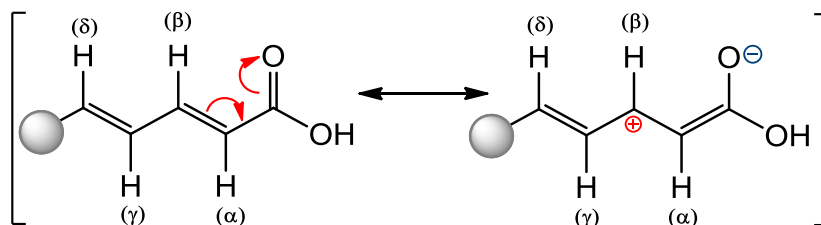


Fig. 4.5: Desproteção do próton  $H_\beta$  por efeito mesomérico negativo.

No composto 1, o  $H(5)$  apresenta-se num desvio químico igual a 7,32 ppm, enquanto  $H(2)$  e  $H(6)$  surgem num multiplete com um desvio químico médio igual a 7,43 ppm. Comparando com o composto de partida (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), observa-se um aumento do desvio químico do sinal de  $H(5)$  ( $\delta=7,04$  ppm) sem alteração significativa dos desvios químicos dos restantes prótons, o que indica que o grupo protetor exerce a desproteção de  $H(5)$  por efeito indutivo negativo.

No composto 4, o efeito indutivo negativo derivado da presença de dois grupos protetores é ainda mais acentuado, observando-se o aumento do desvio químico dos prótons  $H(2)$ ,  $H(5)$  e  $H(6)$  relativamente ao sinal dos mesmos prótons no 3,4-dihidroxibenzaldeído.



Nos compostos 2 e 5, os desvios químicos de H(2), H(6) e, em menor extensão, H(5) são inferiores aos dos aldeídos correspondentes (compostos 1 e 4, respetivamente). Assim sendo, é possível inferir que a introdução do espaçador protege os prótons do anel aromático.

Por último, com a remoção do grupo MEM observa-se a diminuição do desvio químico de H(5) no composto DC1 e de H(2), H(6) e H(5) no composto DC2 relativamente aos respetivos compostos protegidos. Também se verifica a diminuição do desvio químico de H $\beta$  e H $\delta$  (fig. 4.6).

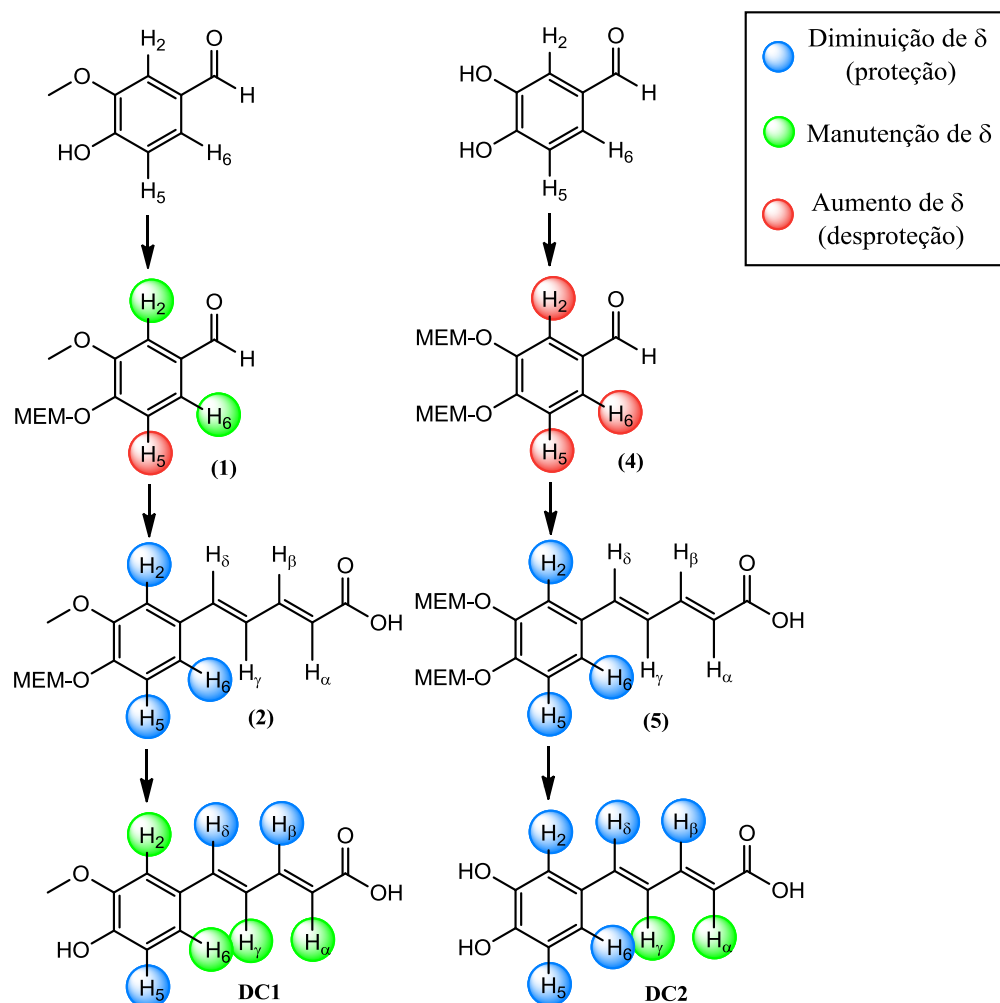


Fig. 4.6: representação da proteção/desproteção dos prótons dos compostos comparativamente com o intermediário anterior.

#### 4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono, DEPT e HSQC

Os dados obtidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  estão sumariados na tabela 4.8. Os resultados obtidos a partir e DEPT permitiram a identificação dos carbonos primários, secundários, terciários e, por subtração, dos quaternários. O espectro obtido por HSQC possibilitou a

atribuição da maioria dos sinais aos carbonos correspondentes através do acoplamento com os respetivos prótons (fig. 4.7).

Relativamente ao anel aromático de todos os compostos, os carbonos terciários surgem em desvios químicos inferiores relativamente aos carbonos quaternários. O carbono C(2) apresenta-se com um desvio químico que varia entre os 110 e os 116 ppm, seguindo-se C(5) (109-117 ppm), C(6) (121-127 ppm), C(1) (128-132 ppm), C(3) (146-150 ppm) e, por fim, C(4) (148-153 ppm).

O carbono do grupo  $\text{OCH}_3$  aparece num desvio químico de cerca de 56 ppm, enquanto o carbono do grupo  $\text{CHO}$  surge aos 190 ppm.

Os sinais característicos dos carbonos do grupo MEM aparecem da seguinte forma: entre 71 e 72 ppm surge o sinal correspondente a  $\text{OCH}_3$ , seguindo-se o  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  e  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  (68-69 ppm e 71-72 ppm, respetivamente) e, finalmente,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (94-95 ppm).

Os carbonos do espaçador surgem de acordo com a seguinte ordem:  $\text{C}\delta$  (116-117 ppm),  $\text{C}\beta$  (122-123 ppm),  $\text{C}\alpha$  (141-142 ppm),  $\text{C}\gamma$  (145-147 ppm) e  $\text{COOH}$  (168-170 ppm).

Tabela 4.8: resultados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados.

		Comp. 1	Comp. 4	Comp. 2	Comp. 5	DC1	DC2	DC3
Anel aromático	C1	131,07	132,08	130,71	130,93	128,11	128,14	129,40
	C2	109,53	116,38	110,15	115,74	111,36	113,66	110,50
	C3	150,03	148,29	147,83	147,29	148,31	146,11	149,40
	C4	151,92	153,53	149,82	148,45	148,59	147,64	150,39
	C5	114,82	117,34	115,35	116,56	116,34	116,35	112,41
	C6	126,30	127,10	121,64	123,88	121,39	120,77	121,16
	CHO	190,89	192,74	—	—	—	—	—
	$\text{OCH}_3$	55,93	—	56,02	—	56,05	—	55,93 56,02
Grupo MEM	$\text{OCH}_2\text{O}$	93,93	94,87 95,36	94,29	94,26 94,75	—	—	—
	$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$	71,38	72,35 72,40	71,54	71,55	—	—	—
	$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$	68,17	69,08 69,15	67,96	67,97 68,00	—	—	—
	$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$	58,88	59,95 59,98	59,03	59,04 59,05	—	—	—
Espaçador	$\text{C}\alpha$	—	—	142,40	142,04	141,84	141,78	141,39
	$\text{C}\beta$	—	—	123,49	122,28	122,32	122,04	123,14
	$\text{C}\gamma$	—	—	147,33	147,15	145,28	145,25	145,02
	$\text{C}\delta$	—	—	116,09	116,56	117,11	116,98	117,69
	COOH	—	—	170,72	170,93	167,95	168,12	167,89

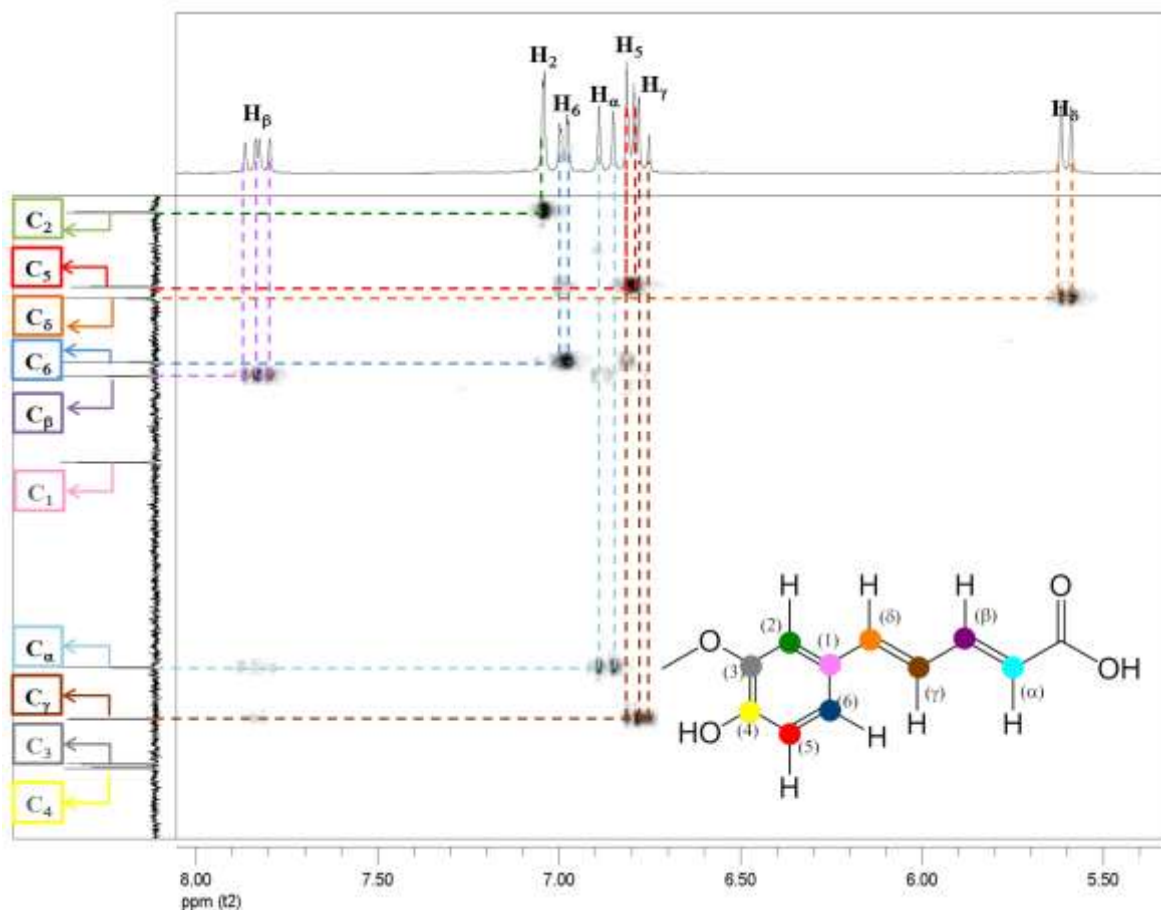


Fig. 4.7: HSQC do composto DC1.

## 4.3 Avaliação da atividade antioxidante

### 4.3.1 Neutralização de radicais livres

Após a síntese e elucidação estrutural, avaliou-se a capacidade de neutralização de radicais livres dos compostos sintetizados (DC1, DC2 e DC3), dos ácidos ferúlico (FER) e cafeico (CAF), e do trolox (TRX). Para tal, foram utilizados os radicais DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e GO<sup>•</sup>.

Os resultados obtidos a partir destas metodologias não podem ser comparados entre si devido a diferenças na natureza química dos radicais, no mecanismo de neutralização e nas concentrações usadas nos ensaios, as quais se traduzem em valores distintos de IC<sub>50</sub>. No entanto, é possível tirar conclusões gerais através de comparações estabelecidas no mesmo tipo de ensaio. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 4.9 e nas figuras 4.8 a 4.10.

De acordo com os valores apresentados na tabela, o ácido cafeico e o composto DC2 possuem valores de  $IC_{50}$  mais baixos. Além disso, atendendo às figuras 4.8 a 4.10, o declive da fase de crescimento das curvas é maior para os compostos referidos, o que indica que a eficiência da reação para concentrações crescentes é maior comparativamente ao FER e ao composto DC1. O composto DC3, por outro lado, não neutralizou nenhum dos radicais na gama de concentrações utilizadas em cada uma das metodologias. Estes resultados sugerem que, tal como tem vindo a ser descrito, a presença de um anel aromático com grupos hidroxilo, preferencialmente ligados na posição *orto*, é uma característica estrutural importante para uma boa atividade antioxidante.

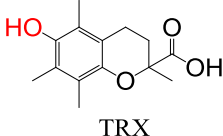
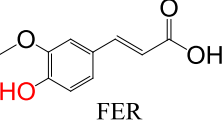
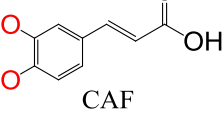
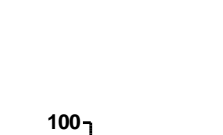
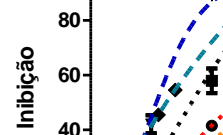
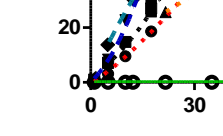
No método do DPPH $\cdot$  (fig. 4.8 e tabela 4.9), o valor de  $IC_{50}$  do DC1 sofre uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , fig. 4.8b) relativamente ao composto de origem natural (FER), o que indica uma melhoria na atividade antioxidante neste modelo *in vitro*. O mesmo não se observa no par DC2/CAF, havendo uma manutenção da capacidade de neutralização do DPPH $\cdot$  (fig. 4.8b). No entanto, ambos (DC2/CAF) são mais eficazes na neutralização do DPPH $\cdot$  que o antioxidante de referência (TRX,  $p < 0,0001$ , fig. 4.8b).

Por outro lado, no método do ABTS $\cdot\cdot^+$  (fig. 4.9 e tabela 4.9) observa-se uma diminuição do  $IC_{50}$  com a introdução de uma ligação dupla no espaçador existente entre o anel aromático e o ácido carboxílico. Este aumento de atividade é estatisticamente significativa entre todos os pares (DC1/FER e DC2/CAF,  $p < 0,0001$ , fig. 4.9b). De igual forma, todos os compostos apresentam maior atividade na neutralização do ABTS $\cdot\cdot^+$  comparativamente ao antioxidante de referência (TRX,  $p < 0,0001$ , fig. 4.9b).

Tal como se observou no método do DPPH $\cdot$ , usando o método do GO $\cdot$  (fig. 4.10 e tabela 4.9) os valores de  $IC_{50}$  do par DC2/CAF são semelhantes em termos estatísticos. A neutralização do radical GO $\cdot$  por estes catecóis é, no entanto, significativamente superior à do antioxidante de referência (TRX vs CAF,  $p < 0,05$ ; TRX vs DC2,  $p < 0,01$  fig. 4.8b). No caso do par DC1/FER, os valores de  $IC_{50}$  são estatisticamente diferentes, mas a diferença existente entre eles é muito elevada. Esta discrepância pode resultar de uma menor velocidade de neutralização do radical GO $\cdot$  pelo FER, não sendo atingido o equilíbrio da reação no período de tempo do ensaio.

Com base nestes resultados, é possível inferir que a ligação dupla adicional nos ácidos hidroxicinâmicos mantém ou aumenta a capacidade de neutralização de radicais livres.

Tabela 4.9: valores de  $IC_{50}$  determinados pelos métodos de  $DPPH^{\cdot}$ ,  $ABTS^{\cdot+}$  e  $GO^{\cdot}$  de todos os compostos analisados.

		$IC_{50}/\mu M$		
Composto		$DPPH^{\cdot}$	$ABTS^{\cdot+}$	$GO^{\cdot}$
	TRX	49,3 $\pm$ 1,7	23,9 $\pm$ 0,8	26,54 $\pm$ 0,81
	CAF	21,7 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	2,68 $\pm$ 0,11
	DC1	43,5 $\pm$ 2,5	19,7 $\pm$ 0,3	4,79 $\pm$ 0,06
	DC2	19,9 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 0,7	2,52 $\pm$ 0,05
	DC3	>75	> 50	>15
	TRX	30,8 $\pm$ 0,1	28,7 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1

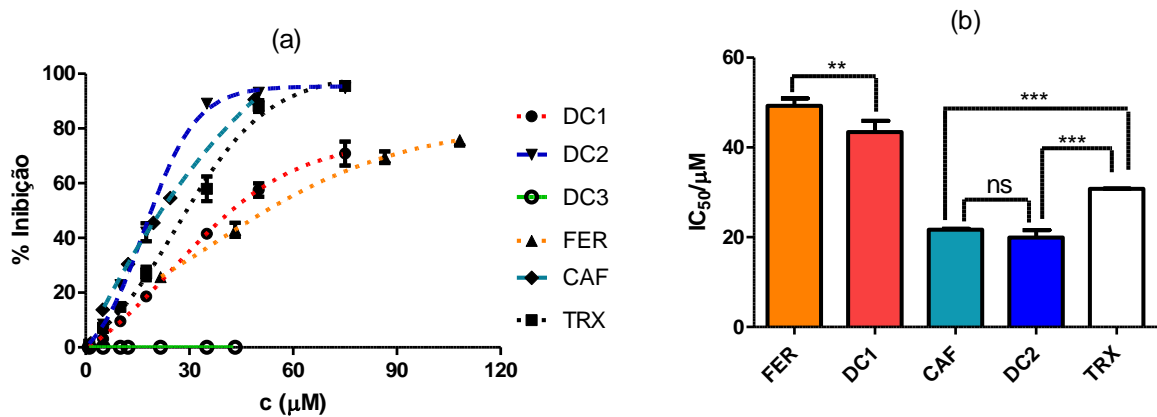


Fig. 4.8: (a) representação gráfica da percentagem de inibição de radical  $DPPH^{\cdot}$  em função da concentração de composto-teste  $[c(\mu M)]$ . (b) Análise estatística dos valores de  $IC_{50}$  obtidos pelo método referido. Significado estatístico vs. controlo: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; n.s: sem significado.

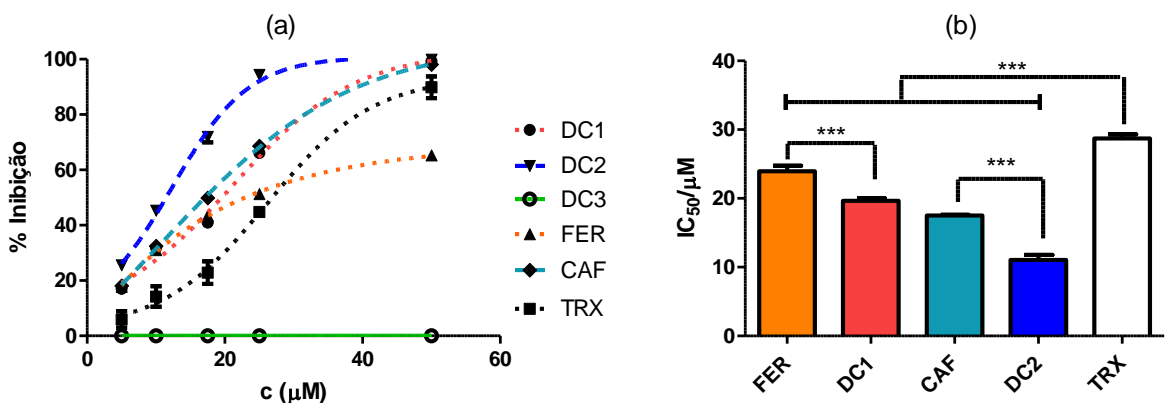


Fig. 4.9: (a) representação gráfica da percentagem de inibição de radical  $ABTS^{\cdot+}$  em função da concentração de composto-teste  $[c(\mu M)]$ . (b) Análise estatística dos valores de  $IC_{50}$  obtidos pelo método referido. Significado estatístico vs. controlo: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; n.s: sem significado.

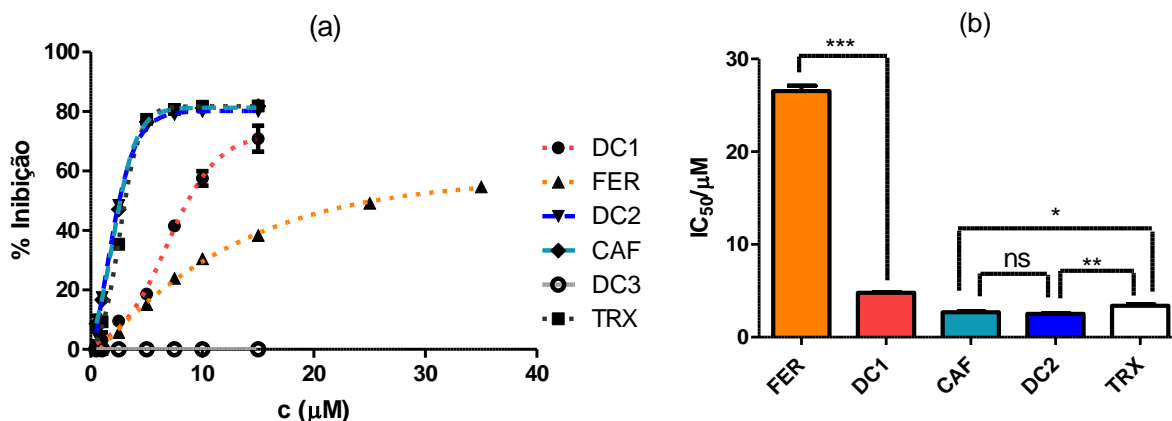


Fig. 4.10: (a) representação gráfica da percentagem de inibição de radical  $GO^{\cdot}$  em função da concentração de composto-teste [ $c(\mu M)$ ]. (b) Análise estatística dos valores de  $IC_{50}$  obtidos pelo método referido. Significado estatístico vs. controlo: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; n.s: sem significado.

#### 4.3.2 Quelatação do ferro (II)

Como foi referido anteriormente, a capacidade de quelatação do ferro (II) pelos compostos DC1, DC2, DC3, trolox e ácidos ferúlico e cafeico foi avaliada através do método da ferrozina. Os resultados encontram-se na fig. 4.11.

Excetuando o composto DC3, os resultados obtidos para os restantes compostos são estatisticamente diferentes do controlo negativo, o que significa que estes têm capacidade de formar complexos com o ferro (II). A atividade quelante dos compostos orto-difenólicos (DC2 e CAF) foi superior à dos compostos monofenólicos (DC1, FER e TRX). Como os compostos DC1 e DC2 apresentaram, respetivamente, maior e menor percentagem de quelatação do ferro (II) quando comparados com os respetivos ácidos hidroxicinâmicos, não foi possível encontrar uma correlação entre o aumento do número de ligações duplas e a complexação com o metal de transição.

Os compostos com dois ou mais grupos hidroxilo têm uma maior tendência para apresentar atividade quelante. [132] De facto, os catecóis são considerados bons agentes quelantes porque, a pH fisiológico, têm tendência a formar complexos com geometria octaédrica com o ferro na proporção de três moléculas para um centro metálico. [56]

Os compostos DC1 e FER possuem apenas um grupo hidroxilo. O grupo metoxilo em posição *orto* pode também exercer um efeito negativo na ligação ao ferro (II). [133]

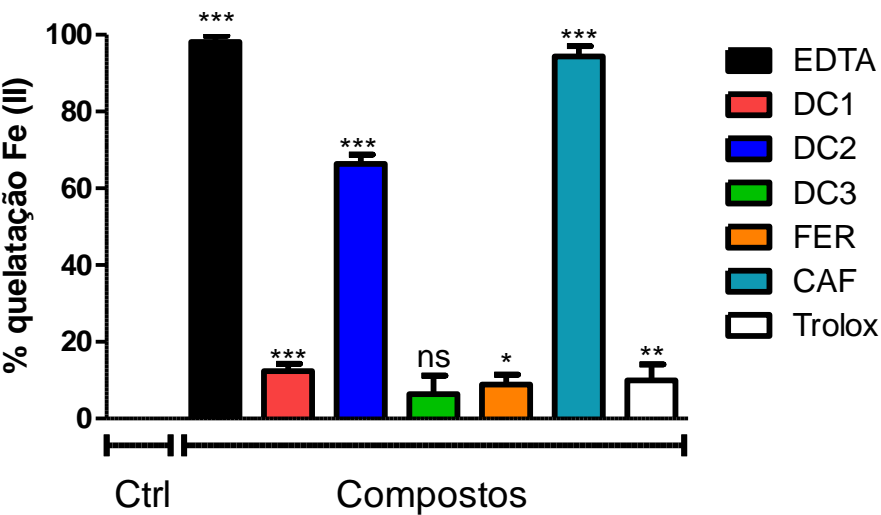


Fig. 4.11: percentagem de quelatação do ferro dos compostos analisados a uma concentração de 100  $\mu$ M. Significado estatístico vs. controlo: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,0001$ ; n.s: sem significado.

#### 4.4 Estudos eletroquímicos: avaliação do potencial redox

A voltametria de impulso diferencial pode ser usada na medição do potencial redox ( $E_p$ ) dos compostos, o qual está correlacionado com a atividade antioxidante dos compostos – em geral, quanto menor for o valor de  $E_p$ , maior é a atividade antioxidante. Os valores de potencial redox dos compostos DC1, DC2 e DC3 e dos respetivos ácidos cinâmicos obtidos por voltametria de impulso diferencial encontram-se apresentados na tabela 4.10. Os voltamogramas de impulso diferencial obtidos estão representados na fig. 4.12.

Tabela 4.10: potenciais redox dos compostos sintetizados e dos respetivos ácidos cinâmicos.

Composto	E/mV
FER	346; 440
CAF	168
DMC	1071; 1255; 1402
DC1	299; 516; 1240
DC2	155
DC3	868; 1040; 1375

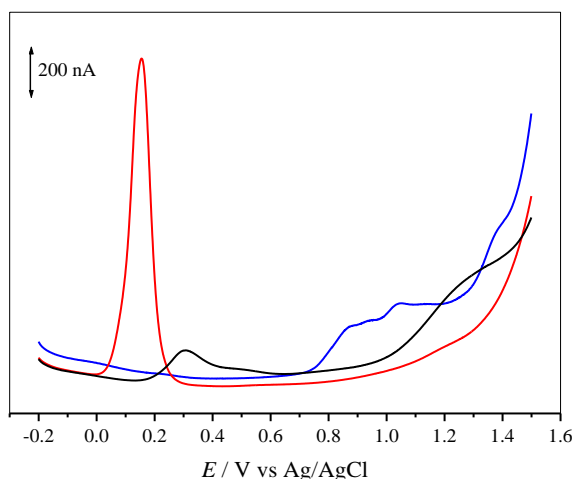


Fig. 4.12: Voltamogramas de impulso diferencial de soluções 0,1 mM de (—) DC1, (—) DC2 e (—) DC3 em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varrimento: 5 mV s<sup>-1</sup>

Os compostos DC1, DC2 e DC3 possuem um  $E_p$  mais baixo comparativamente aos dos ácidos cinâmicos. Dentro destes dois grupos, os compostos com um grupo catecol (composto DC2 e ácido cafeico) apresentam valores inferiores de  $E_p$ . Estes resultados demonstram que o acréscimo do número de grupos hidroxilo e o aumento da deslocalização eletrônica propiciam o aumento da capacidade dos compostos se oxidarem. Esta tendência foi observada em estudos anteriores. [17, 77]

Nos voltamogramas de impulso diferencial dos composto FER e DC1 surgiram dois picos anódicos sobrepostos a pH fisiológico (FER:  $E_p$ =+346 mV,  $E'_p$ =+440 mV; DC1:  $E_p$ =+299 mV,  $E'_p$ =+516 mV), sendo ambos resultantes da oxidação do grupo fenoxilo presente nas suas estruturas. Os compostos CAF e DC2 apresentaram apenas um pico anódico nos voltamogramas de impulso diferencial a pH fisiológico (CAF:  $E_p$ =+168 mV; DC2:  $E_p$ =+115 mV). A sua formação está relacionada com a oxidação do grupo catecol presente na estrutura destas moléculas. O estudo dos compostos DC3 e DMC por voltametria de impulso diferencial revelou a presença de três picos de oxidação sobrepostos a pH fisiológico resultantes da ocorrência de processos oxidativos envolvendo o grupo metoxilo ligado ao anel aromático (DMC:  $E_p$ =+1071 mV,  $E'_p$ =+1255 mV,  $E''_p$ =+1402 mV; DC3:  $E_p$ =+868 mV,  $E'_p$ =+1040 mV,  $E''_p$ =+1375 mV).

Na fig. 4.13 observa-se uma boa correlação entre os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos métodos de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e GO<sup>•</sup> e o potencial redox, realçando a ideia de que o mecanismo associado à neutralização de radicais livres passa pela transferência de elétrões por parte do antioxidante.



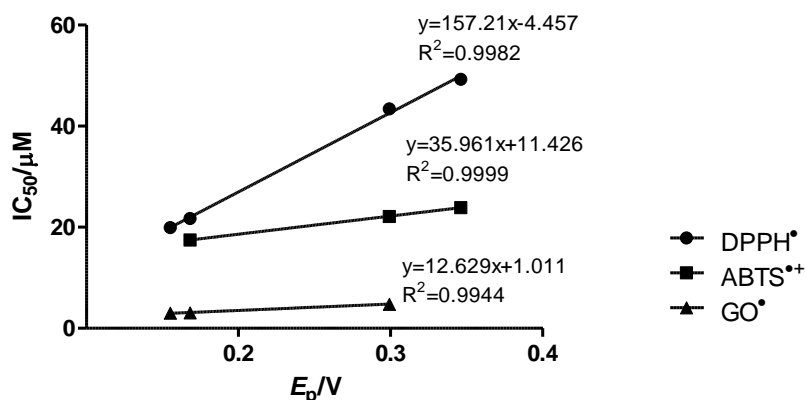


Fig. 4.13: representação gráfica dos valores de  $IC_{50}$  obtidos nos métodos de  $DPPH^\bullet$ ,  $ABTS^{\bullet+}$  e  $GO^\bullet$  em função do potencial redox.

A voltametria cíclica fornece informações acerca da reversibilidade das reações de oxidação. Os voltamogramas dos compostos analisados revelaram comportamentos semelhantes entre cada ácido hidroxicinâmico e o respetivo derivado.

Os compostos DC2 e CAF apresentaram dois picos (anódico e catódico) característicos de uma reação de oxidação reversível (fig. 4.14). A oxidação do grupo fenólico em posição *p*- e consequente formação de uma *orto*-quinona (fig. 4.15) origina o aparecimento de um pico anódico durante o varrimento de potencial no sentido da oxidação. A inversão do potencial aplicado permite a ocorrência de um pico catódico resultado da redução da *orto*-quinona ao polifenol inicial (fig. 4.15).

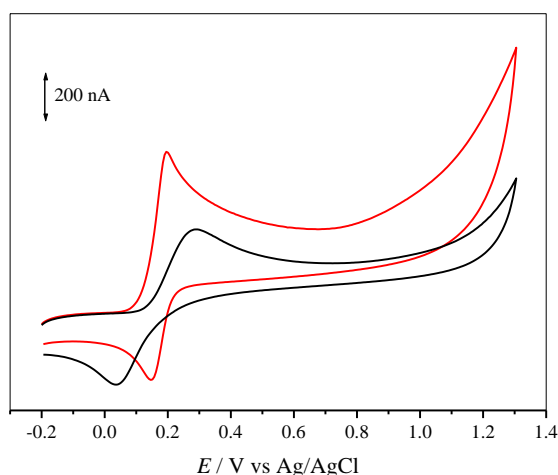


Fig. 4.14: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) CAF e (—) DC2 em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varrimento =  $20 \text{ mV.s}^{-1}$ .

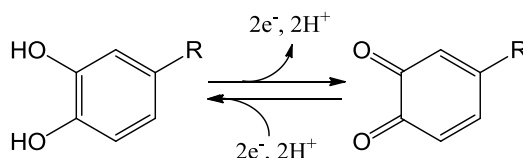


Fig. 4.15: reversibilidade da reação de oxidação de catecóis. Adaptado de [134].

Nos voltamogramas cíclicos dos compostos DC1 e FER surgiu apenas um pico anódico resultante da ocorrência de uma oxidação irreversível do grupo fenólico presente na estrutura das moléculas (fig. 4.16). Há evidências que sugerem que, após a oxidação do ácido ferúlico, ocorre a sua dimerização através da ligação de dois radicais fenóxilo. [135] A irreversibilidade da reação de oxidação do composto DC1 pode ficar a dever-se a este fenómeno (fig. 4.17).

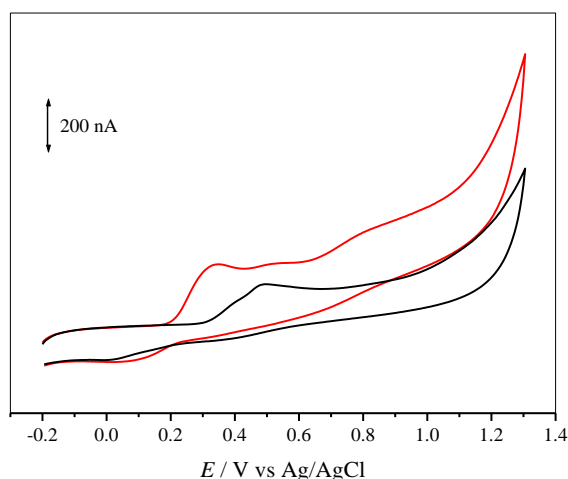


Fig. 4.16: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) FER e (—) DC1 em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varrimento = 20 mV.s<sup>-1</sup>

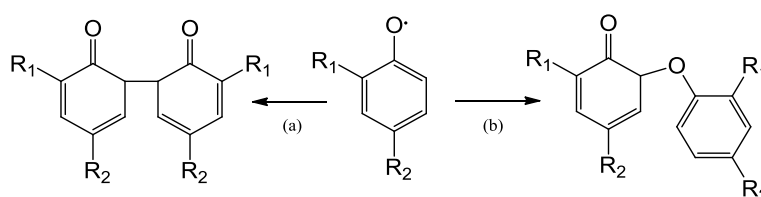


Fig. 4.17: Dimerização do radical fenóxilo através da formação de uma ligação (a) C-C e (b) C-O. Adaptado de [136].

Os voltamogramas cíclicos obtidos para os compostos DC3 e DMC permitem verificar a ocorrência de um pico anódico, sem contrapartida catódica, a potenciais elevados. (fig. 4.18). Dados obtidos anteriormente sugerem que o processo de oxidação ocorre no anel aromático, formando-se um radical catiónico que pode sofrer reações subsequentes. [137]

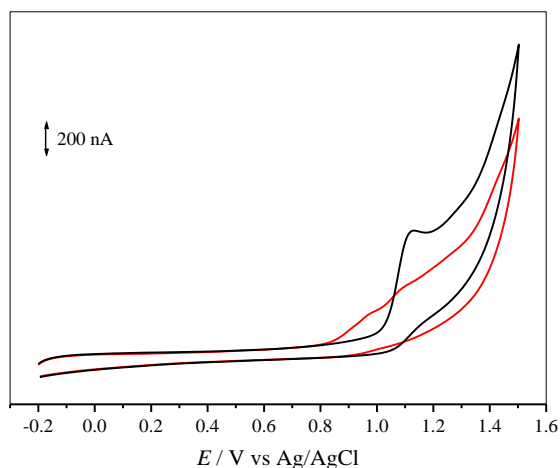


Fig. 4.18: voltamogramas cíclicos de soluções 0,1 mM de (—) DMC e (—) DC3 em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varrimento = 20 mV.s<sup>-1</sup>.

### 4.5 Avaliação das propriedades físico-químicas

De um modo geral, os compostos que atravessam a BHE apresentam lipofilia moderada, peso molecular e flexibilidade baixas e um número reduzido de dadores e aceitadores de hidrogénio (tabela 4.11). [113] As propriedades físico-químicas determinadas *in silico* encontram-se na tabela 4.12.

A introdução de uma ligação dupla adicional nos compostos sintetizados resultou no aumento da lipofilia, do peso molecular e do número de ligações com rotação, mantendo-se os números de dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio. Os valores destas propriedades encontram-se abaixo dos valores da tabela 4.11, sugerindo que os derivados do ácido hidroxycinâmico podem ter a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica por difusão passiva.

Assim, a modificação estrutural efetuada teve dois efeitos benéficos: não só melhorou as propriedades antioxidantes através do incremento da deslocalização eletrónica, como também aumentou a lipofilia, facilitando a passagem dos compostos ao longo das membranas biológicas.

Tabela 4.11: Características gerais de fármacos dirigidos ao SNC. Adaptado de [113].

Característica	Valor
Peso molecular	< 450
LogP	< 5
Número de dadores de hidrogénio	< 3
Número de aceitadores de hidrogénio	< 7
Número de ligações com rotação	< 8

Tabela 4.12: determinação do peso molecular (PM), coeficiente de partilha octanol/água (logP), número de aceitadores de hidrogénio (n-ON), número de dadores de hidrogénio (n-OHNH) e número de ligações com rotação (n-rotb) dos ácidos cinâmicos e seus derivados .

Composto	PM	logP	n-ON	n-OHNH	n-rotb
DMC	208,21	1,556	4	1	4
FER	194,19	1,249	4	2	3
CAF	180,16	0,941	4	3	2
DC3	234,25	2,075	4	1	5
DC1	220,22	1,768	4	2	4
DC2	206,20	1,460	4	3	3

#### 4.6 Avaliação da citotoxicidade e neuroproteção em modelo celular

A citotoxicidade foi avaliada através da determinação da viabilidade celular pelo método do MTT, após a incubação dos compostos sintetizados com as células SH-SY5Y durante um período de 24h. No controlo, adicionou-se meio de cultura (1  $\mu$ L) como substituto da solução dos compostos-teste. Na fig. 4.19 é possível observar que a presença dos derivados do ácido hidroxicinâmico a concentrações de 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M não afeta a viabilidade celular no modelo utilizado. Estes resultados sugerem que os compostos sintetizados não apresentam nenhum efeito citotóxico nas concentrações testadas.

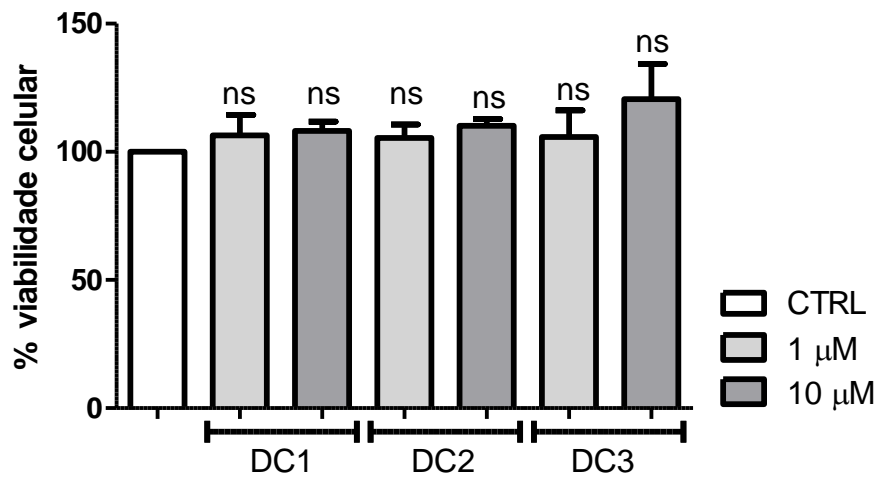


Fig. 4.19: citotoxicidade dos compostos sintetizados a concentrações de 1 e 10  $\mu$ M. Significado estatístico vs. controlo (CTRL): \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,0001$ ; n.s: sem significado.

Na avaliação das propriedades neuroprotetoras utilizou-se a 6-OH-DA como indutor do stress oxidativo. A viabilidade das células de neuroblastoma após um período

de incubação de 24h com os compostos sintetizados, na presença da 6-OH-DA, está representada na fig. 4.20. A viabilidade celular diminuiu em cerca de 50% na presença do indutor a uma concentração de 100µM. Os compostos DC1 e DC2 atenuaram a citotoxicidade exercida pela 6-OH-DA, sendo esse efeito mais notório para o composto DC2. Por outro lado, a viabilidade celular na presença do composto DC3 iguala a que se observa na incubação apenas com a 6-OH-DA. Os resultados descritos apresentam uma relação direta entre o número de grupos hidroxilo presentes nos compostos e a proteção das células neuronais contra o stress oxidativo induzido pela 6-OH-DA.

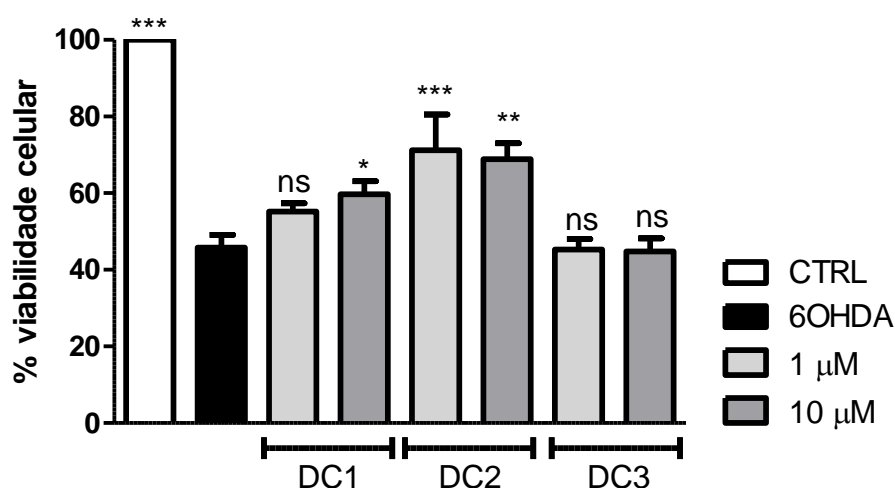


Fig. 4.20: capacidade neuroprotetora dos compostos sintetizados a concentrações de 1 e 10 µM. Significado estatístico vs. 6-OH-DA: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; n.s: sem significado.

Os desvios-padrão elevados representados nos ensaios em células podem ser consequência de diferenças no metabolismo celular. Como a redução do MTT ocorre apenas em células vivas, alterações na atividade metabólica celular podem gerar alguma variabilidade nos resultados mesmo que o número de células viáveis seja constante. [138]

Alguns estudos já realizados revelaram que os ácidos ferúlico e cafeico não previnem a morte de células neuronais resultante de danos oxidativos provocados por um indutor. [77, 139, 140] No entanto, há evidências que indicam que estes compostos podem ser neuroprotetores através de outros mecanismos. Sul, D. *et al.* demonstraram que o ácido cafeico tem uma ação protetora contra a neurotoxicidade induzida pela A $\beta$  através da inibição do influxo de cálcio e da fosforilação da tau. [141] A administração a longo termo de ácido ferúlico também pode prevenir a toxicidade mediada pela A $\beta$  através da inibição da ativação da microglia. [142]

## 5.Considerações finais e perspectivas futuras

Neste projeto, a síntese de três compostos finais num passo reacional (DC3) ou numa sequência de três passos (DC1 e DC2) foi alcançada com sucesso. As técnicas de ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional e de espectrometria de massa de impacto electrónico, utilizadas na sua caracterização estrutural, comprovaram a identidade estrutural dos compostos sintetizados.

Posteriormente, foram realizados diversos ensaios *in vitro*. Os resultados obtidos nos métodos do DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e GO<sup>•</sup> mostraram que a introdução de uma ligação dupla adicional na estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos manteve ou melhorou a capacidade de neutralização de radicais. Os métodos eletroquímicos permitiram não só o estabelecimento de uma relação direta entre essa atividade e a capacidade das moléculas cederem eletrões, como também a avaliação da (ir)reversibilidade da reação de oxidação. Na avaliação da quelatação de metais de transição, a presença de grupos hidroxilo em posição *orto* nos polifenóis é uma característica importante na formação de complexos com o ferro (II). A introdução de uma ligação dupla nos ácidos hidroxicinâmicos traduziu-se num aumento da lipofilia, o qual pode ter um impacto positivo na passagem ao longo das membranas biológicas. Por último, no modelo celular utilizado, os compostos sintetizados não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas e protegeram as células neuronais contra os danos oxidativos.

Atendendo aos resultados obtidos, o derivado do ácido hidroxicinâmico com dois grupos hidroxilo (DC2) exibiu características interessantes para o desenvolvimento de antioxidantes com potencial terapêutico. De todos os compostos analisados, este derivado apresentou uma maior atividade neuroprotetora contra danos oxidativos, e manteve/melhorou as propriedades associadas à atividade antioxidante do modelo natural (ácido cafeico).

No sentido de dar continuidade ao trabalho realizado, dever-se-ão desenvolver novas estratégias de síntese do composto DC2 com o intuito de obter uma quantidade superior de produto final para a síntese de derivados. A atividade antioxidante contra radicais produzidos *in vivo*, como os radicais superóxido e hidroxilo, deverá também ser avaliada. No sentido de validar a alteração estrutural efectuada como promotora da biodisponibilidade, a avaliação da passagem dos compostos sintetizados ao longo da barreira hematoencefálica poderá ser avaliada em modelos *in vitro* (ex.: PAMPA-BBB) ou recorrendo a estudos com linhas celulares de barreira hematoencefálica (ex.: RBE). Os potenciais efeitos ao nível da expressão genética, em particular na modulação do Nrf2, podem ser avaliados em modelo celular recorrendo à quantificação do RNA mensageiro (mRNA) por reacção de polimerização em cadeia (RT-PCR). Por último, a avaliação dos

efeitos dos compostos sintetizados na agregação da A $\beta$  também pode fornecer dados importantes sobre a capacidade de neuroprotecção em modelos de doenças neurodegenerativas.



## 6. Referências bibliográficas

- [1] H. E. de Vries, M. Witte, D. Hondius, A. J. M. Rozemuller, B. Drukarch, J. Hoozemans, and J. van Horssen, "Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 10, pp. 1375–1383, Nov. 2008.
- [2] O. Firuzi, R. Miri, M. Tavakkoli, and L. Saso, "Antioxidant therapy: current status and future prospects.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 25, pp. 3871–3888, Jan. 2011.
- [3] K. Dasuri, L. Zhang, and J. N. Keller, "Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 62, pp. 170–185, Sep. 2013.
- [4] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, Jan. 2007.
- [5] L. M. Sayre, G. Perry, and M. a Smith, "Oxidative stress and neurotoxicity.," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 172–188, Jan. 2008.
- [6] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006.
- [7] K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, and M. Valko, "Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 345, no. 1–2, pp. 91–104, Dec. 2010.
- [8] S. Ghosh and S. C. Erzurum, "Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1810, no. 11, pp. 1008–1016, Nov. 2011.
- [9] E. D. Hall, J. A. Wang, and D. M. Miller, "Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury.," *Exp. Neurol.*, vol. 238, no. 2, pp. 176–182, Dec. 2012.
- [10] Y.-C. Sun, P.-Y. Chang, K.-C. Tsao, T.-L. Wu, C.-F. Sun, L. L. Wu, and J. T. Wu, "Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and

- complementary between 3NT and myeloperoxidase.,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 378, no. 1–2, pp. 175–180, Mar. 2007.
- [11] V. Chauhan and A. Chauhan, “Oxidative stress in Alzheimer’s disease.,” *Pathophysiology*, vol. 13, no. 3, pp. 195–208, Aug. 2006.
- [12] B. Uttara, A. V Singh, P. Zamboni, and R. T. Mahajan, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 65–74, Mar. 2009.
- [13] K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, “Neurodegenerative diseases and oxidative stress.,” *Nat. Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 205–214, Mar. 2004.
- [14] S. Giordano, V. Darley-Usmar, and J. Zhang, “Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease.,” *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 82–90, Jan. 2014.
- [15] L. Dupuis, “Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases.,” *Biochimie*, vol. 100, pp. 177–183, May 2014.
- [16] L. Migliore and F. Coppedè, “Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging.,” *Mutat. Res.*, vol. 674, no. 1–2, pp. 73–84, Mar. 2009.
- [17] F. M. F. Roleira, C. Siquet, E. Orrù, E. M. Garrido, J. Garrido, N. Milhazes, G. Podda, F. Paiva-Martins, S. Reis, R. Carvalho, E. J. T. da Silva, and F. Borges, “Lipophilic phenolic antioxidants: correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties.,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 16, pp. 5816–5825, Aug. 2010.
- [18] M. Greenough, J. Camakaris, and A. I. Bush, “Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer’s disease.,” *Neurochem. Int.*, vol. 62, no. 5, pp. 540–555, Apr. 2013.
- [19] E. Galea, N. Launay, M. Portero-Otin, M. Ruiz, R. Pamplona, P. Aubourg, I. Ferrer, and A. Pujol, “Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases?,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1822, no. 9, pp. 1475–1488, Sep. 2012.

- [20] M. C. O. Rodrigues, P. R. Sanberg, L. E. Cruz, and S. Garbuzova-Davis, "The innate and adaptive immunological aspects in neurodegenerative diseases.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 269, no. 1–2, pp. 1–8, Apr. 2014.
- [21] J. Poirier, J. Miron, C. Picard, P. Gormley, L. Thérout, J. Breitner, and D. Dea, "Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease.," *Neurobiol. Aging*, vol. 35, pp. S3–S10, Sep. 2014.
- [22] Y. Feng and X. Wang, "Antioxidant therapies for Alzheimer's disease.," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, pp. 1–17, Jan. 2012.
- [23] A. M. Swomley, S. Förster, J. T. Keeney, J. Triplett, Z. Zhang, R. Sultana, and D. A. Butterfield, "A $\beta$ , oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, no. 8, pp. 1248–1257, Aug. 2014.
- [24] R. A. J. Smith, R. C. Hartley, H. M. Cocheme, and M. P. Murphy, "Mitochondrial pharmacology," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 33, no. 6, pp. 341–352, 2012.
- [25] X. Wang, W. Wang, L. Li, G. Perry, H. Lee, and X. Zhu, "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, pp. 1240–1247, 2014.
- [26] A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen, and M. A. Smith, "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 60, no. 8, pp. 759–767, Aug. 2001.
- [27] M. A. Liebert, R. Sultana, and M. Perluigi, "Protein Oxidation and Lipid Peroxidation in Brain of Subjects Neurodegeneration from Redox Proteomics," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 11–12, pp. 2021–2037, 2006.
- [28] J. Teixeira, T. Silva, P. Andrade, and F. Borges, "Alzheimer's Disease and Antioxidant Therapy: How Long How Far?," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 24, pp. 2939–2952, Jul. 2013.
- [29] D. A. Butterfield, A. Castegna, C. M. Lauderback, and J. Drake, "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's

- disease brain contribute to neuronal death,” *Neurobiol. Aging*, vol. 23, pp. 655–664, 2002.
- [30] R. Perfeito, T. Cunha-Oliveira, and A. C. Rego, “Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease—resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 62, pp. 186–201, Sep. 2013.
- [31] O. Hwang, “Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease,” *Exp. Neurobiol.*, vol. 22, no. 1, pp. 11–17, 2013.
- [32] P. Muñoz, S. Huenchuguala, I. Paris, and J. Segura-Aguilar, “Dopamine oxidation and autophagy,” *Parkinsons. Dis.*, vol. 2012, pp. 1–13, Jan. 2012.
- [33] B. Halliwell, “Biochemistry of oxidative stress.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 5, pp. 1147–1150, Nov. 2007.
- [34] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, “A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 51, pp. 15–25, Jan. 2013.
- [35] P. G. Pietta, “Flavonoids as antioxidants.,” *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, Jul. 2000.
- [36] M. Goodman, R. M. Bostick, O. Kucuk, and D. P. Jones, “Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 5, pp. 1068–1084, Sep. 2011.
- [37] J. Bouayed and T. Bohn, “Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 3, no. 4, pp. 228–237, 2010.
- [38] M. Nardini, E. Cirillo, F. Natella, and C. Scaccini, “Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 20, pp. 5735–5741, Sep. 2002.

- [39] M. Nardini, F. Natella, C. Scaccini, and A. Ghiselli, "Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 1, pp. 14–22, Jan. 2006.
- [40] M. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, and T. Bahorun, "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.," *Mutat. Res.*, vol. 579, no. 1–2, pp. 200–213, Nov. 2005.
- [41] C. G. Fraga, M. Galleano, S. V Verstraeten, and P. I. Oteiza, "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 435–445, Dec. 2010.
- [42] H. R. El-Seedi, A. M. A. El-Said, S. A. M. Khalifa, U. Göransson, L. Bohlin, A.-K. Borg-Karlson, and R. Verpoorte, "Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 44, pp. 10877–10895, Nov. 2012.
- [43] A. Ebrahimi and H. Schluesener, "Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls.," *Ageing Res. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 329–345, Apr. 2012.
- [44] I. Ignat, I. Volf, and V. I. Popa, "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables," *Food Chem.*, vol. 126, no. 4, pp. 1821–1835, Jun. 2011.
- [45] S. Khadem and R. J. Marles, "Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies.," *Molecules*, vol. 15, no. 11, pp. 7985–8005, Nov. 2010.
- [46] D. Ravishankar, A. K. Rajora, F. Greco, and H. M. I. Osborn, "Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 12, pp. 2821–2831, Dec. 2013.
- [47] M. A. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy, and C. Ramassamy, "Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 4855–4873, 2008.

- [48] D. V. Ratnam, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana, and M. N. V. R. Kumar, "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective.," *J. Control. release*, vol. 113, no. 3, pp. 189–207, Jul. 2006.
- [49] M. Leopoldini, N. Russo, and M. Toscano, "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants," *Food Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 288–306, Mar. 2011.
- [50] A. Benayahoum, H. Amira-Guebailia, and O. Houache, "Homolytic and heterolytic O–H bond cleavage in trans-resveratrol and some phenantrene analogs: A theoretical study," *Comput. Theor. Chem.*, vol. 1037, pp. 1–9, Jun. 2014.
- [51] A. Vagánek, J. Rimarčík, V. Lukeš, and E. Klein, "On the energetics of homolytic and heterolytic OH bond cleavage in flavonoids," *Comput. Theor. Chem.*, vol. 991, pp. 192–200, Jul. 2012.
- [52] Y. Xue, Y. Zheng, L. An, Y. Dou, and Y. Liu, "Density functional theory study of the structure-antioxidant activity of polyphenolic deoxybenzoins.," *Food Chem.*, vol. 151, pp. 198–206, May 2014.
- [53] M. Musialik, R. Kuzmicz, T. S. Pawłowski, and G. Litwinienko, "Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids.," *J. Org. Chem.*, vol. 74, no. 7, pp. 2699–2709, Apr. 2009.
- [54] M. Szeląg, D. Mikulski, and M. Molski, "Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and its metabolites.," *J. Mol. Model.*, vol. 18, no. 7, pp. 2907–2916, Jul. 2012.
- [55] R. Sánchez-Vioque, M. Polissiou, K. Astraka, M. D. L. Mozos-Pascual, P. Tarantilis, D. Herraiz-Peñalver, and O. Santana-Méridas, "Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry," *Ind. Crops Prod.*, vol. 49, pp. 150–159, Aug. 2013.
- [56] N. R. Perron and J. L. Brumaghim, "A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding.," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 53, no. 2, pp. 75–100, Jan. 2009.
- [57] K. Jomova and M. Valko, "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease.," *Toxicology*, vol. 283, no. 2–3, pp. 65–87, May 2011.

- [58] Q. Ma, "Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 53, pp. 401–426, Jan. 2013.
- [59] H. Kumar, I.-S. Kim, S. V. More, B.-W. Kim, and D.-K. Choi, "Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, no. 1, pp. 109–139, Jan. 2014.
- [60] A. Gopalakrishnan and A.-N. Tony Kong, "Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1257–1270, Apr. 2008.
- [61] A. T. Dinkova-Kostova and X. J. Wang, "Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 192, no. 1–2, pp. 101–106, Jun. 2011.
- [62] G. T. Wondrak, C. M. Cabello, N. F. Villeneuve, S. Zhang, S. Ley, Y. Li, Z. Sun, and D. D. Zhang, "Cinnamoyl-based Nrf2-activators targeting human skin cell photo-oxidative stress.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 4, pp. 385–395, Aug. 2008.
- [63] G. Scapagnini, S. Vasto, V. Sonya, N. G. Abraham, A. G. Nader, C. Caruso, C. Calogero, D. Zella, and G. Fabio, "Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders.," *Mol. Neurobiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 192–201, Oct. 2011.
- [64] S. Magesh, Y. Chen, and L. Hua, "Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents," *Med. Res. Rev.*, vol. 32, no. 4, pp. 687–726, 2013.
- [65] Q. R. D. Jones, J. Warford, H. P. V. Rupasinghe, and G. S. Robertson, "Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 33, no. 11, pp. 602–610, Nov. 2012.
- [66] P. Pacher, A. Nivorozhkin, and C. Szabó, "Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol," *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, no. 1, pp. 87–114, 2008.



- [67] Y.-C. Chang, F.-W. Lee, C.-S. Chen, S.-T. Huang, S.-H. Tsai, S.-H. Huang, and C.-M. Lin, "Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 11, pp. 1541–1551, Dec. 2007.
- [68] H.-C. Lin, S.-H. Tsai, C.-S. Chen, Y.-C. Chang, C.-M. Lee, Z.-Y. Lai, and C.-M. Lin, "Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 6, pp. 1416–1425, Mar. 2008.
- [69] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: food sources and bioavailability.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, May 2004.
- [70] A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, and C. Rémésy, "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 6, pp. 276–282, Aug. 2002.
- [71] J. Teixeira, T. Silva, S. Benfeito, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, and F. Borges, "Exploring nature profits: development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloyl-cinnamic hybrids.," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 62, pp. 289–296, Apr. 2013.
- [72] S. Benfeito, C. Oliveira, P. Soares, C. Fernandes, T. Silva, J. Teixeira, and F. Borges, "Antioxidant therapy: still in search of the 'magic bullet'.," *Mitochondrion*, vol. 13, no. 5, pp. 427–435, Sep. 2013.
- [73] R. J. Robbins, "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 2866–2887, May 2003.
- [74] P. Mattila, J. Hellström, and R. Törrönen, "Phenolic acids in berries, fruits, and beverages.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 19, pp. 7193–7199, Sep. 2006.
- [75] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, Jan. 2006.

- [76] M. Andjelkovic, J. Vancamp, B. Demeulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaciu, M. Verloo, and R. Verhe, "Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups," *Food Chem.*, vol. 98, no. 1, pp. 23–31, 2006.
- [77] J. Garrido, A. Gaspar, E. M. Garrido, R. Miri, M. Tavakkoli, S. Pourali, L. Saso, F. Borges, and O. Firuzi, "Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress," *Biochimie*, vol. 94, no. 4, pp. 961–967, Apr. 2012.
- [78] J. Teixeira, P. Soares, S. Benfeito, A. Gaspar, J. Garrido, M. P. Murphy, and F. Borges, "Rational discovery and development of a mitochondria-targeted antioxidant based on cinnamic acid scaffold.," *Free Radic. Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 600–611, May 2012.
- [79] T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 4th ed. New Jersey: Wiley, p. 369, 2007.
- [80] P. J. Kocienski, *Protecting groups*, 3rd ed. Stuttgart: Thieme, pp. 293–294, 2005.
- [81] X. Lei and J. a Porco, "Total synthesis of the diazobenzofluorene antibiotic (-)-kinamycin C1.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 46, pp. 14790–14791, Nov. 2006.
- [82] R. Bäckström, E. Honkanen, A. Pippuri, P. Kairisalo, J. Pystynen, K. Heinola, E. Nissinen, I. B. Linden, P. T. Männistö, and S. Kaakkola, "Synthesis of some novel potent and selective catechol O-methyltransferase inhibitors.," *J. Med. Chem.*, vol. 32, no. 4, pp. 841–846, Apr. 1989.
- [83] A. S. Lee, Y. Hu, and S. Chu, "A simple and highly efficient deprotecting method for methoxymethyl and methoxyethoxymethyl ethers and methoxyethoxymethyl esters," vol. 57, pp. 2121–2126, 2001.
- [84] D. Michelot and M. Meyer, "Facile protection of phenols and hydroxypyridines: key components of natural products-a new pathway to orellanine.," *Nat. Prod. Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 41–6, Jan. 2003.
- [85] R. Mondal, C. Guha, and A. K. Mallik, "Facile conversion of para-benzoquinones to para-alkoxyphenols with primary/secondary alcohols and amberlyst-15: a process showing novel reducing property of such alcohols," *Tetrahedron Lett.*, vol. 55, no. 1, pp. 86–89, Jan. 2014.

- [86] X. Tian and K. M. Schaich, "Effects of Molecular Structure on Kinetics and Dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay with ABTS<sup>+</sup>," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, pp. 5511–5519, 2013.
- [87] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, Nov. 2011.
- [88] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results," *Food Chem.*, vol. 130, no. 4, pp. 1036–1043, Feb. 2012.
- [89] K. H. Musa, A. Abdullah, B. Kuswandi, and M. A. Hidayat, "A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity.," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 4102–4106, Dec. 2013.
- [90] Z. Chen, R. Bertin, and G. Frolidi, "EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs.," *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 414–420, May 2013.
- [91] A. C. Guedes, H. M. Amaro, M. S. Gião, and F. X. Malcata, "Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria.," *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 638–643, May 2013.
- [92] C. Sanchez-Moreno, "Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems," *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 8, no. 3, pp. 121–137, Jun. 2002.
- [93] L. L. Lumata, M. E. Merritt, C. R. Malloy, A. D. Sherry, J. van Tol, L. Song, and Z. Kovacs, "Dissolution DNP-NMR spectroscopy using galvinoxyl as a polarizing agent.," *J. Magn. Reson.*, vol. 227, pp. 14–19, Feb. 2013.
- [94] A. Barzegar and A. a Moosavi-Movahedi, "Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin.," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, pp. 1–7, Jan. 2011.
- [95] S. Nagaoka, K. Nagai, Y. Fujii, A. Ouchi, and K. Mukai, "Development of a new free radical absorption capacity assay method for antioxidants: aroxyl radical absorption

- capacity (ARAC).,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 42, pp. 10054–10062, Oct. 2013.
- [96] A. Tai, T. Sawano, and H. Ito, “Antioxidative Properties of Vanillic Acid Esters in Multiple Antioxidant Assays,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 76, no. 2, pp. 314–318, May 2014.
- [97] J.-Y. Feng and Z.-Q. Liu, “Phenolic and enolic hydroxyl groups in curcumin: which plays the major role in scavenging radicals?,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 22, pp. 11041–11046, Nov. 2009.
- [98] Y. Yang, Z.-G. Song, and Z.-Q. Liu, “Synthesis and antioxidant capacities of hydroxyl derivatives of cinnamoylphenethylamine in protecting DNA and scavenging radicals,” *Free Radic. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 445–453, Apr. 2011.
- [99] P. Mladěnka, K. Macáková, T. Filipský, L. Zatloukalová, L. Jahodář, P. Bovicelli, I. P. Silvestri, R. Hrdina, and L. Saso, “In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 5, pp. 693–701, May 2011.
- [100] E. Viollier, P. W. Inglett, K. Hunter, A. N. Roychoudhury, and P. Van Cappellen, “The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters,” *Appl. Geochemistry*, vol. 15, no. 6, pp. 785–790, Jul. 2000.
- [101] L. L. Stookey, “Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron,” *Anal. Chem.*, vol. 42, no. 7, pp. 779–781, Jun. 1970.
- [102] C. Y. Huang, R. Zhou, D. C. H. Yang, and P. Boon Chock, “Application of the continuous variation method to cooperative interactions: mechanism of Fe(II)-ferrozine chelation and conditions leading to anomalous binding ratios,” *Biophys. Chem.*, vol. 100, no. 1–3, pp. 143–149, Jan. 2003.
- [103] C. M. M. Santos, M. B. Q. Garcia, A. M. S. Silva, R. Santos, P. Morlière, and E. Fernandes, “Electrochemical characterization of bioactive hydroxyxanthenes by cyclic voltammetry,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 54, no. 1, pp. 85–90, Jan. 2013.
- [104] F. M. a. Lino, L. Z. de Sá, I. M. S. Torres, M. L. Rocha, T. C. P. Dinis, P. C. Ghedini, V. S. Somerset, and E. S. Gil, “Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines,” *Electrochim. Acta*, vol. 128, pp. 25–31, May 2014.

- [105] R. Gulaboski and C. M. Pereira, *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, pp. 379–402, 2008.
- [106] M. Abou Samra, V. S. Chedea, A. Economou, A. Calokerinos, and P. Kefalas, “Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 622–629, Mar. 2011.
- [107] A. Reichel, “Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery: basics and implications of the evolving new concept,” *Chem. Biodivers.*, vol. 6, no. 11, pp. 2030–2049, Nov. 2009.
- [108] P. Jeffrey and S. Summerfield, “Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 33–37, Jan. 2010.
- [109] J. M. Scherrmann, “Drug delivery to brain via the blood-brain barrier,” *Vascul. Pharmacol.*, vol. 38, no. 6, pp. 349–354, Jun. 2002.
- [110] Y. Chen and L. Liu, “Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 7, pp. 640–665, May 2012.
- [111] X. Liu, C. Chen, and B. J. Smith, “Progress in Brain Penetration Evaluation in Drug Discovery and Development,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 325, no. 2, pp. 349–356, 2008.
- [112] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 46, no. 1–3, pp. 3–26, Mar. 2001.
- [113] H. Pajouhesh and G. R. Lenz, “Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs,” *NeuroRx*, vol. 2, no. 4, pp. 541–53, Oct. 2005.
- [114] C. A. S. Bergström, R. Holm, S. A. Jørgensen, S. B. E. Andersson, P. Artursson, S. Beato, A. Borde, K. Box, M. Brewster, J. Dressman, K.-I. Feng, G. Halbert, E. Kostewicz, M. McAllister, U. Muenster, J. Thinner, R. Taylor, and A. Mullertz, “Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 57, pp. 173–199, Jun. 2014.

- [115] M. Lobell, M. Hendrix, B. Hinzen, J. Keldenich, H. Meier, C. Schmeck, R. Schohe-Loop, T. Wunberg, and A. Hillisch, "In silico ADMET traffic lights as a tool for the prioritization of HTS hits.," *ChemMedChem*, vol. 1, no. 11, pp. 1229–1236, Nov. 2006.
- [116] E. Michelini, L. Cevenini, L. Mezzanotte, A. Coppa, and A. Roda, "Cell-based assays: fuelling drug discovery.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 227–238, Sep. 2010.
- [117] E. L. Berg, Y.-C. Hsu, and J. A. Lee, "Consideration of the cellular microenvironment: Physiologically relevant co-culture systems in drug discovery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 69–70C, pp. 190–204, Apr. 2014.
- [118] R. Zang, D. Li, I. Tang, J. Wang, and S. Yang, "Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery," *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.*, vol. 1, no. 1, pp. 31–51, 2012.
- [119] K. Tieu, D. M. Zuo, and P. H. Yu, "Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 58, no. 3, pp. 426–435, Nov. 1999.
- [120] F. M. Lopes, R. Schröder, M. L. C. da Frota, A. Zanotto-Filho, C. B. Müller, A. S. Pires, R. T. Meurer, G. D. Colpo, D. P. Gelain, F. Kapczinski, J. C. F. Moreira, M. D. C. Fernandes, and F. Klamt, "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies.," *Brain Res.*, vol. 1337, pp. 85–94, Jun. 2010.
- [121] S. P. Presgraves, T. Ahmed, S. Borwege, and J. N. Joyce, "Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists.," *Neurotox. Res.*, vol. 5, no. 8, pp. 579–598, Jan. 2004.
- [122] A. Romero, E. Ramos, V. Castellano, M. A. Martínez, I. Ares, M. Martínez, M. R. Martínez-Larrañaga, and A. Anadón, "Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants.," *Toxicol. Vitr.*, vol. 26, no. 6, pp. 823–30, Sep. 2012.
- [123] K. Gilany, R. Van Elzen, K. Mous, E. Coen, W. Van Dongen, S. Vandamme, K. Gevaert, E. Timmerman, J. Vandekerckhove, S. Dewilde, X. Van Ostade, and L.

- Moens, "The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: an enlarged proteome.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1784, no. 7–8, pp. 983–985, 2008.
- [124] F. Blandini, M.-T. Armentero, and E. Martignoni, "The 6-hydroxydopamine model: news from the past.," *Parkinsonism Relat. Disord.*, vol. 14, pp. S124–S129, Jan. 2008.
- [125] M. P. Cunha, M. D. Martín-de-Saavedra, A. Romero, E. Parada, J. Egea, L. Del Barrio, a L. S. Rodrigues, and M. G. López, "Protective effect of creatine against 6-hydroxydopamine-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of intracellular signaling pathways.," *Neuroscience*, vol. 238, pp. 185–194, May 2013.
- [126] R. Scherliess, "The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells.," *Int. J. Pharm.*, vol. 411, no. 1–2, pp. 98–105, Jun. 2011.
- [127] G. Fotakis and J. A. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride.," *Toxicol. Lett.*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177, Jan. 2006.
- [128] H. Wang, H. Cheng, F. Wang, D. Wei, and X. Wang, "An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 82, no. 3, pp. 330–333, Sep. 2010.
- [129] A. R. Lupu and T. Popescu, "The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO<sub>2</sub> nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays.," *Toxicol. In Vitro*, vol. 27, no. 5, pp. 1445–1450, Aug. 2013.
- [130] J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, and A. Villanueva, "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.," *Acta Histochem.*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, Dec. 2012.
- [131] Y. Li, F. Dai, X. Jin, M. Ma, Y. Wang, X. Ren, and B. Zhou, "An effective strategy to develop active cinnamic acid-directed antioxidants based on elongating the conjugated chains," *Food Chem.*, vol. 158, pp. 41–47, 2014.

- [132] I. Gülçin, "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid).," *Toxicology*, vol. 217, no. 2–3, pp. 213–220, Jan. 2006.
- [133] S. Maqsood and S. Benjakul, "Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince," *Food Chem.*, vol. 119, no. 1, pp. 123–132, Mar. 2010.
- [134] O. Makhotkina and P. A. Kilmartin, "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 668, no. 2, pp. 155–165, Jun. 2010.
- [135] S. K. Trabelsi, N. B. Tahar, B. Trabelsi, and R. Abdelhedi, "Electrochemical Oxidation of Ferulic Acid in Aqueous Solutions at Gold Oxide and Lead Dioxide Electrodes," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 35, no. 10, pp. 967–973, Oct. 2005.
- [136] M. C. Foti, "Antioxidant properties of phenols.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 59, no. 12, pp. 1673–1685, Dec. 2007.
- [137] E. M. Garrido, J. Garrido, R. Calheiros, M. P. M. Marques, and F. Borges, "Fluoxetine and norfluoxetine revisited: new insights into the electrochemical and spectroscopic properties.," *J. Phys. Chem.*, vol. 113, no. 36, pp. 9934–9944, Sep. 2009.
- [138] M. Boncler, M. Różalski, U. Krajewska, A. Podśędek, and C. Watala, "Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells.," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 69, no. 1, pp. 9–16, 2014.
- [139] S.-E. Im, H. Yoon, T.-G. Nam, H. J. Heo, C. Y. Lee, and D.-O. Kim, "Antineurodegenerative effect of phenolic extracts and caffeic acid derivatives in romaine lettuce on neuron-like PC-12 cells.," *J. Med. Food*, vol. 13, no. 4, pp. 779–784, Aug. 2010.
- [140] H. Zhang, S. Mak, W. Cui, W. Li, R. Han, S. Hu, M. Ye, R. Pi, and Y. Han, "Tacriner(2)-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells by activating Akt pathway.," *Neurochem. Int.*, vol. 59, no. 7, pp. 981–988, Dec. 2011.



- [141] D. Sul, H.-S. Kim, D. Lee, S. S. Joo, K. W. Hwang, and S.-Y. Park, "Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation.," *Life Sci.*, vol. 84, no. 9–10, pp. 257–262, Feb. 2009.
  
- [142] J.-Y. Cho, H.-S. Kim, D.-H. Kim, J.-J. Yan, H.-W. Suh, and D.-K. Song, "Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on astrocyte activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice.," *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 29, no. 6, pp. 901–907, Jul. 2005.

